

VISIT...

LANZAROTE
Caliente.COM

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
Институт биоорганической химии
им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова



ПРОБЛЕМА БЕЛКА

В ПЯТИ ТОМАХ

Том 1. ХИМИЧЕСКОЕ СТРОЕНИЕ БЕЛКА

Том 2. ПРОСТРАНСТВЕННОЕ СТРОЕНИЕ БЕЛКА

Том 3. СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ БЕЛКА

Том 4. СТРУКТУРА И ФУНКЦИЯ БЕЛКА

Том 5. СТРУКТУРА, ФУНКЦИЯ
И ЭВОЛЮЦИЯ БЕЛКА

Ответственный редактор
академик В.Т. ИВАНОВ



МОСКВА "НАУКА" 1996

ПРОБЛЕМА БЕЛКА

Том
2

ПРОСТРАНСТВЕННОЕ СТРОЕНИЕ БЕЛКА

Редактор тома
кандидат химических наук
Т.И. СОРКИНА



МОСКВА "НАУКА" 1996

ББК 24.239
П 78
УДК 577.112.5

А в т о р ы :

Е.М. ПОПОВ (главы 1—5, 7—13, 15), В.В. ДЕМИН (глава 6),
Е.М. ПОПОВ совместно с Е.Д. ШИБАНОВОЙ (глава 14)

Р е ц е н з е н т ы :

член-корреспондент РАН А.И. МИРОШНИКОВ,
доктор физико-математических наук В.Г. ТУМАНЯН

П 78 **Проблема** белка. Том 2: Пространственное строение белка /
Е.М. Попов, В.В. Демин, Е.Д. Шибанова. — М.: Наука,
1996. — 480 с. Ил.
ISBN 5-02-001697-7, т. 2

Коллективная монография посвящена экспериментальным и концептуальным исследованиям пространственного строения белковых молекул с момента возникновения работ в этой области и по сегодняшний день. Книга состоит из трех частей. В первой части рассмотрены исследования трехмерных структур белков. Во второй части проанализированы эмпирические подходы к предсказанию вторичной, супервторичной и третичной структур белковых молекул. В третьей части обсуждены механизмы спонтанной укладки белка в нативную конформацию. Значительное внимание уделено общим вопросам термодинамики и кинетики свертывания белковой цепи; изложена общая теория структурной самоорганизации белка, основанная на нелинейной неравновесной термодинамике.

Для специалистов, работающих в области химии, биологии и медицины.

П 1903010000-037
042(02)-96 191-95, II полугодие

ББК 24.239

Problem of the protein. Vol. 2: Spatial structure of the protein/
Е.М. Popov, V.V. Demin, E.D. Shibanova. — М.: Nauka, 1996. —
480 p. Ill.
ISBN 5-02-001697-7, vol. 2

Covering theory and experiment, this volume offers a comprehensive overview of the spatial structure of the protein molecules, reviewing the first steps and current developments in this area. The book consists of three parts — the first focuses on studies on the three-dimensional proteins structures. The second provides an empiric insight into the attempts to forecast a secondary, a supersecondary, and a tertiary structure of the protein molecules. The third embraces the mechanisms of the protein spontaneous arrangement into the native conformation.

For investigators engaged or with an interest in chemistry, biology and medicine.

ISBN 5-02-001691-8
ISBN 5-02-001697-7, т. 2

© Е.М. Попов, В.В. Демин,
Е.Д. Шибанова, 1996
© Издательство "Наука",
оформление, 1996
© Российская академия наук, 1996

ПРЕДИСЛОВИЕ

Данная монография, вторая из намеченных нами в серии книг по проблеме белка, посвящена экспериментальным и концептуальным исследованиям пространственного строения белковых молекул с момента возникновения работ в этой области и по сегодняшний день. Она является продолжением первой из задуманных монографий, в которой в том же плане рассмотрены этапы развития исследований химической структуры белковых молекул¹.

При изложении истории структурных исследований белка наибольшее внимание было обращено на позитивные результаты. Будучи расположенными в логическом порядке, они образуют строго последовательный ряд переходов от простого к сложному, от менее полных и несовершенных представлений к более полным и совершенным. Хотя такое описание не лишено смысла, оно далеко от реального, полного драматизма процесса научного познания, где встречаются заблуждения, серьезные противоречия, и которое постоянно находится под прессом устаревших представлений, стереотипных аналогий и неадекватных оценок проблемной ситуации, часто не воспринимаемых критически. Поэтому в монографии предпринята попытка проследить за внутренней логикой развития исследований пространственного строения белков, не сглаживая при этом противоречивый характер самого процесса и не затушевывая ставшие очевидными недостатки работ.

Критический анализ пройденного пути в данном случае представляется особенно важным, поскольку по своим свойствам, в том числе молекулярной организации, белок является уникальным объектом исследования, как правило, требующего отказа от традиционных подходов и представлений. Все выдающиеся достижения в решении фундаментальных задач проблемы белка, оцененные Нобелевской премией, были получены лишь на основе оригинальных концепций, качественно новых теорий и экспериментальных методов. Одновременно такого уровня исследования всегда оказывались высшими достижениями физики, химии или биологии. Во многих отношениях проблема белка является проблемой всего естествознания. Поэтому для понимания ее длительной и непростой истории изложение в монографии всех

¹ Проблема белка. Т.1. Химическое строение белка / Под ред. В.Г. Иванова, Е.М. Попова. М.: Наука. 1995.

этапов развития исследований пространственного строения белков соотнесено с общим ходом развития естественнонаучных знаний и показана обусловленность решения данной задачи прогрессом всего естествознания.

Книга состоит из трех частей. В первой части рассмотрены история экспериментальных исследований пространственного строения синтетических полипептидов и белков и складывающиеся на этой основе представления об их молекулярной структурной организации. Особо выделены три события, во многом определивших последующее развитие этой области и становление самой молекулярной биологии. Первые два вызваны появлением в 1951 г. работ Л. Полинга и Р. Кори и в 1959 г. работы У. Козмана, которые сразу же обратили на себя внимание научной общественности и оказали сильное стимулирующее влияние на теоретическое и экспериментальное изучение пространственного строения белков. Третье событие произошло на рубеже 1950—1960-х годов и было связано с расшифровкой Дж. Кендрию и М. Перутцем трехмерных структур первых белковых молекул. Наибольшее внимание в первой части, как и в двух других, уделено анализу современных исследований и перспективам развития. Вторая часть книги посвящена детальному анализу эмпирического подхода к предсказанию вторичных структур и более высоких уровней пространственной организации глобулярных белков. В отдельной главе отмечены перспективы развития этого подхода. В третьей части изложена история исследований механизма свертывания белковой цепи в нативную конформацию в условиях *in vitro* и *in vivo*. В последней главе рассмотрена общая теория структурной самоорганизации белка, разработанная на основе нелинейной термодинамики неравновесных процессов.

Ответственный редактор и авторы выражают глубокую признательность Т.И. Соркиной и ее сотрудникам: В.В. Егоровой, Е.Г. Гавриловой, Л.И. Петровой и Н.Н. Шумаковой, роль которых на всем протяжении подготовки настоящего издания трудно переоценить.

В.Т. Иванов, Е.М. Попов

Часть I

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОСТРАНСТВЕННОГО СТРОЕНИЯ БЕЛКОВ

Глава 1

СТРУКТУРНЫЕ МОДЕЛИ ПОЛИПЕПТИДНЫХ ЦЕПЕЙ

Возможность осуществления белками разнообразных и многочисленных функций не может быть, как ожидалось ранее, прямо связана с химическим строением молекул, так как все белки являются полипептидами, построенными из одних и тех же двадцати основных аминокислот. Напрашивалась мысль, что химическая универсальность и практически необозримое многообразие свойств соединений этого класса как-то связаны с пространственным строением молекул. Впервые такую мысль высказали в 1930 г. К. Мейер и Г. Марк [1–3]. Ими же было сделано предположение о зависимости механических свойств белков от пространственной формы полипептидных цепей. Г. Марк, изучая дифракцию рентгеновских лучей, показал, что растяжение и сокращение мускулов сопровождаются обратимым изменением трехмерной структуры мышечных белков, т.е. работа мышц в конечном счете сводится к внутримолекулярному процессу.

Исследование пространственной структуры белков началось за много лет до окончательного установления их химического строения [4]. Обе задачи в течение почти четверти века решались одновременно, оказывая друг на друга большое влияние.

1.1. ПЕРВЫЕ РЕНТГЕНОСТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ФИБРИЛЛЯРНЫХ БЕЛКОВ

В 1912 г. М. Лауэ разработал теорию интерференции рентгеновских лучей на кристаллах, приняв их за естественные для жесткого излучения дифракционные решетки. Теория Лауэ тотчас же получила экспериментальное подтверждение в опытах В. Фридриха и П. Книппинга. В этом же году У. и Л. Брэгг осуществили кристаллографическое исследование ряда образцов и дали экспериментальное доказательство периодичности атомной структуры кристаллов. В 1912 г.

Л. Брэгг вывел уравнение, связывающее длину волны рентгеновского излучения с периодом идентичности кристаллической решетки. Несколькими месяцами позднее такое же уравнение было получено независимо Г. Вульфом.

Первыми объектами рентгеноструктурного анализа стали фибриллярные белки, а среди них – фиброин шелка. Его рентгенограмма получена в 1920 г. Р. Герцогом и У. Янке [5–7] и несколько позднее Р. Бриллем [8]. Было обнаружено, что белок состоит из кристаллической и аморфной частей. В состав кристаллической части входят только глицин и аланин в соотношении 1:1. Со ссылкой на Н.Д. Зеллинского (независимо это сделать было нельзя) авторы высказали предположение, что аминокислотные остатки образуют в белке метилдикетопиперазины; во всяком случае, полициклическая структура белка не противоречила наблюдаемой дифракционной картине. Сторонники diketopiperazine теории восприняли это не как предположение, а как независимое экспериментальное доказательство ангидридного строения белковых молекул и в течение длительного времени ссылались на работы Герцога и Брилля, якобы подтверждавших справедливость их точки зрения. Серию интересных исследований структуры высокомолекулярных органических соединений, в том числе и белков, выполнили в 1920-е годы Мейер и Марк [3, 9]. В отношении химической организации этих соединений они придерживались мнения Г. Штаудингера, а в отношении природы белков – представлений Э. Фишера. Г. Штаудингер впервые (1922 г.) предположил, что высокомолекулярные соединения не являются веществами, состоящими из небольших, ассоциированных в растворе в крупные агрегаты молекул, наподобие коагулянтов, как считали раньше, а представляют собой структуры, все звенья которых валентно связаны между собой, образуя линейные, разветвленные, плоские или пространственные сетчатые цепи главных валентностей.

К. Мейер и Г. Марк изучили дифракционную картину фиброина шелка и пришли к выводу, что она значительно лучше соответствует полипептидному строению белка, чем diketopiperazineovому, принятому Герцогом, Янке и Бриллем. Они интерпретировали интенсивный рефлекс, характеризующий расстояние между слоевыми плоскостями в 7,0 Å, как период идентичности полностью вытянутой цепи с *транс*-конфигурацией пептидных групп. Они считали, что цепь ориентирована параллельно оси волокна, а боковые цепи $R_1, R_2, \dots, R_n$ располагаются соответственно выше и ниже плоскости цепи. В этом случае длина цепи на аминокислотный остаток составляет 3,5 Å. Рефлекс 7,0 Å представляет собой скелетный внутрицепочечный период идентичности с полифункциональными боковыми цепями. Появление данного рефлекса в дифракционной картине фиброина шелка Мейер и Марк (в согласии с пептидной теорией Фишера и результатами химического исследования этого же белка) связывали с чередованием в белковой цепи остатков глицина и аланина. Молекулярную организацию фиброина шелка авторы представили в виде пакетов. Было отмечено, что в противо-

положность целлюлозе, каучуку, полистиролу и другим высокомолекулярным соединениям, построенным повторением одного и того же элементарного звена (гомополимерам), белки содержат около 20 различных звеньев в линейной цепи и, следовательно, являются гетерополимерами. Авторы, правда в осторожной форме, делают важное заключение: "Не будет ошибочным сопоставление особого биологического значения белков с их внутримолекулярным многообразием" [2. С. 51].

Таким образом, в период наивысшего расцвета дикетопиперазиновой теории Н.Д. Зелинского, В.С. Садикова и Э. Абдергальдена на основании результатов физических экспериментов К. Мейер и Г. Марк приходят к представлению о белковой молекуле как о длинной полипептидной цепи, состоящей из определенного количества и определенным образом расположенных аминокислотных остатков. Все свойства белков, считают они, в конечном счете обусловлены структурой этой цепи.

О. Кратки (1929 г.) выделил высокоориентированную, кристаллическую часть фиброина шелка и исследовал на ней дифракцию рентгеновских лучей. Он определил параметры моноклинной элементарной ячейки, предположив, что через ячейку проходят четыре параллельные полипептидные цепи из остатков аланина и глицина. О. Кратки рассчитал плотность белка; полученная им величина ($1,46 \text{ г/см}^3$) удовлетворительно совпала с известными тогда экспериментальными значениями ($1,33\text{--}1,46 \text{ г/см}^3$). Дифракционная карта и интенсивность рефлексов хорошо согласовывались с предположением о плоской структуре полипептидных цепей и их параллельном расположении. По определению Кратки расстояние между цепями главных валентностей составило $4,4$ и $4,8 \text{ \AA}$.

Одним из самых распространенных структурных белков является коллаген. Он входит в соединительную ткань и служит основным компонентом сухожилий, костей и связок. При продолжительном нагревании коллагена с водой он становится растворимым и превращается в желатин. Рентгеновскую дифракцию на коллагене из сухожилий впервые наблюдали Р. Герцог и У. Янке (1926 г.), а на желатине – П. Шеррер (1920 г.), который пришел к выводу о его аморфном строении. Повторные исследования желатина Дж. Катцем и О. Гернгроссом (1925 г.) показали, однако, что наряду с интерференцией аморфной части он дает кристаллическую интерференцию. В растянутом состоянии желатин имеет диаграмму волокнистого вещества. Авторы сделали вывод, что при переработке коллагена в желатин его мицеллы, дающие такого вида дифракционную картину, существенно не меняются. Период идентичности по оси волокна у коллагена, согласно Н. Сузиху, равен $8,4 \text{ \AA}$, а у фиброина шелка, по данным О. Кратки, – $7,0 \text{ \AA}$. Значительное различие этих величин свидетельствует о разной пространственной структуре коллагеновых и фибринозных цепей, что, в свою очередь, указывает на различие в химическом строении.

Ранее, в 1920 г., Г. Дакин определил аминокислотный состав белка сухожилия. Оказалось, что 25% приходится на глицин и приблизительно

столько же на пролин и оксипролин (суммарно). Рентгеновская диаграмма, а также оптическая анизотропия, расщепляемость волокон, различное набухание вдоль и поперек волокна свидетельствуют о том, что в направлении волокна действуют наиболее жесткие силы – главные валентности, а перпендикулярно – слабые силы межмолекулярных взаимодействий. К. Мейером обнаружено, что при нагревании вещество сухожилия сжимается в направлении волокна и приобретает эластичность [3]. При этом рефлексы в дифракционной картине, характерные для волокнистых структур, исчезают; при растяжении вещества они полностью восстанавливаются. К. Мейер провел аналогию между свойствами белка и каучука. В нагретом, сжатом состоянии белок по механическим свойствам сходен с аморфным каучуком, который получается при его нагревании. В условиях нормальной температуры свойства белка напоминают свойства растянутого каучука. О. Герингросс и Дж. Катц (1930 г.) наблюдали подобную зависимость и провели такую же аналогию между веществом сухожилия и каучуком. Из анализа результатов этих экспериментов Мейер и Марк сделали вывод, что белковые цепи при особых обстоятельствах могут существовать в полностью растянутом, а при других – в изогнутом виде.

Отмеченные работы представляют собой первую попытку связать механические свойства белкового вещества с его химическим и пространственным строением. Дальнейшим развитием этого направления можно считать изучение Мейером мышечных белков. Было показано, что макроскопическое сокращение мускулов связано с изменением молекулярной формы белковых цепей. Проведя совместное механическое и рентгеноструктурное исследование, Мейер пришел к заключению, что в ослабленных мускулах имеются параллельно ориентированные цепи главных валентностей, а в сокращенных их нет. Он наблюдал дифракционную диаграмму у высушенного в растянутом виде мускула, типичную для волокнистой структуры, отвечающую аморфному состоянию. Такой интерпретации удовлетворяли данные опытов с замороженным белком. Растянутый мускул легко расслаивался при температуре жидкого воздуха вдоль предполагаемых волокон, тогда как сокращенный препарат в этих же условиях распадался на комочки. По этому поводу Мейер в 1930 г. писал: "Белковые цепи, скрепляющиеся друг с другом по всей длине мускула в определенных местах посредством молекулярных сил сцепления несольватируемых групп или какими-нибудь другими связями и сокращающиеся или растягивающиеся под влиянием меняющейся величины рН, должны вызывать сокращения или же ослабления на протяжении всей длины мускула. Этим макроскопическое сокращение сводится в конце концов к внутримолекулярному процессу" [3. С. 435]. И далее он делает не менее важное и новое для того времени замечание: "Нет сомнения в том, что источником мускульной энергии и причиной движения является химический выделяющий энергию процесс" [3. С. 438; см. также 4. С. 64].

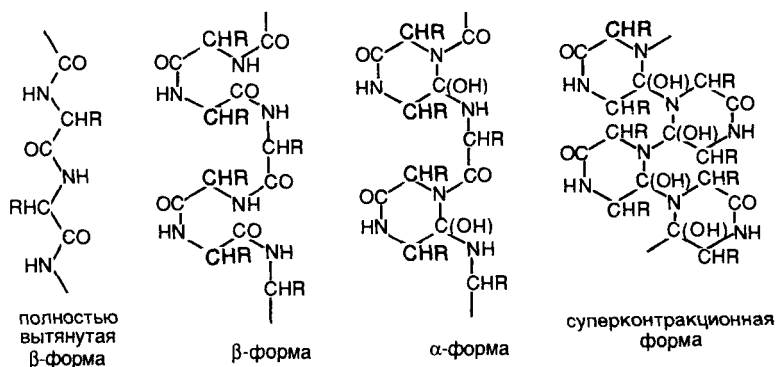
Дальнейшее развитие этого направления связано прежде всего с именем У. Астбери, которому принадлежат во многом основополагающие рентгеноструктурные исследования белков, проведенные в

1930–1940-е годы. Именно они в наибольшей степени способствовали успешной расшифровке структур биополимеров. У. Астбери в 1946 г. ввел термин "молекулярная биология". Ему одному из первых стало ясно, что изучение конформаций макромолекул имеет решающее значение для понимания функционирования живых организмов. Оценивая вклад Астбери в науку, Дж. Бернал в 1963 г. писал: "Памятник ему будет установлен всей молекулярной биологией – наукой, которую он назвал и действительно основал" [10. С. 31]. Сказано несколько сильно, но, безусловно, Астбери входит в число первых исследователей, чьи работы ускорили становление молекулярной биологии.

Прежде чем рассмотреть исследования Астбери, кратко остановимся на предложенной им классификации белков, в основу которой был положен структурный признак [11, 12]. По этому признаку все белки делятся на два больших класса фибриллярных и глобулярных белков. Первые имеют вытянутую, волокнистую структуру; вторые – форму глобулы (во времена Астбери они назывались корпускулярными белками). Такое разделение отчасти согласуется со спецификой функционирования белков и растворимостью их в воде. Фибриллярные белки входят в состав кожи, соединительных тканей, хрящей, скелета, волос, рогов и т.д. Как правило, в обычных условиях они химически инертны, не растворяются в воде и выполняют структурную или защитную функцию. Глобулярные белки играют активную роль в метаболизме, участвуя во всех процессах жизнедеятельности организма. Многие глобулярные белки растворимы в воде. Четкой структурной или функциональной границы между двумя классами белков, однако, провести нельзя. Например, миозин (белок мышц), хотя и имеет волокнистое строение, тем не менее химически не инертен. Функция миозина связана с превращением химической энергии в механическую работу. Несмотря на значительную условность, предложенная Астбери и сохранившаяся до сих пор классификация белков по структурному признаку остается все еще целесообразной. Сама идея разделения белков в зависимости от топологии структуры хорошо согласуется с одной из задач молекулярной биологии, а именно с установлением связи между строением (в том числе пространственным) и функцией биологических молекул. У. Астбери были изучены структуры разнообразных фибриллярных белков [13, 14]. Оказалось, что эти белки по структурному признаку могут быть разделены на две конформационные группы. Первая группа, названная по начальным буквам входящих в нее белков группой *k.m.e.f.*, включает такие белки, как кератин (белок волос, шерсти, ногтей и т.д.), миозин (белок мышц), эпидермин (белок кожи) и фибриноген (белок плазмы крови). Во вторую группу фибриллярных белков (группа коллагена) входят белки сухожилий, соединительных тканей, хрящей и др. Белки каждой группы имеют близкие картины рентгеновской дифракции, что указывает на их конформационную аналогию.

Наиболее важной особенностью рентгенограмм белков группы *k.m.e.f.* в нормальном состоянии является наличие меридионального рефлекса $5,1 \text{ \AA}$. Конформации белков этой группы Астбери назвал α -

формой. Кератин, миозин, эпидермин и фибриноген обладают сходными эластичными свойствами, а именно способностью под влиянием нагрузки на волокнистый образец увеличивать свою длину приблизительно в два раза. У. Астбери предпринял попытку связать макроскопические свойства белка с его молекулярными конформационными свойствами. При растяжении белковых волокон α -форма кератина, миозина и других переходит в иную, вдвое более вытянутую структуру, которую Астбери назвал β -формой. Рентгенограммы α - и β -форм весьма различны. Характерной особенностью рентгеновской дифракции β -формы является интенсивный меридиональный рефлекс $3,5 \text{ \AA}$, что отвечает длине аминокислотного остатка, а удвоенная величина совпадает с периодом идентичности и плотностью растянутых цепей фиброина шелка. При более умеренном растяжении период идентичности меньше, что свидетельствует о появлении изгибов цепи. В свободном, ненагруженном состоянии кератин имеет свернутую α -форму. У. Астбери удалось обнаружить способность кератина сжиматься при определенных условиях еще сильнее, что было объяснено дальнейшим "складыванием" цепи (суперконтракцией) [15]. Ниже изображены все формы, предложенные Астбери для кератина. Они имеют плоскую, ленточную структуру; переход между ними сопровождается образованием или разрывом валентных связей, т.е. химическим процессом. По Астбери, α - и суперконтракционная формы содержат связанные дикетопиперазиновые циклы, а β -форма является полностью полипептидом.



У. Астбери проведено множество рентгеноструктурных исследований белков, главным образом фибриллярных [16–27]. Им предложено много молекулярных моделей и высказан ряд интересных соображений о пространственной организации белков. За исключением только что рассмотренного исследования кератина, имеющего в отношении химического строения белка компромиссный с дикетопиперазиновой теорией характер, Астбери во всех последующих работах исходил только из полипептидной структуры, которая в нормальных условиях находится в растянутой β -форме. Это β -кератин – белок перьев, клюва, клешней, скорлупы, чешуи и т.д. Рентгенограмма β -кератина близка рентгено-

грамме фиброина шелка. Учитывая нерастяжимость белков в β -форме и интерпретацию Мейера и Марка рентгенограммы фиброина шелка, Астбери приписал β -форме плоскую, полностью вытянутую структуру.

Первая теория Астбери $\alpha \rightleftharpoons \beta$ -перехода, отвергнутая им позднее, основывалась на циклольной гипотезе Д. Ринч и заключалась в замыкании и замыкании гексагональных колец. Такая интерпретация не удовлетворяла ряду экспериментальных данных, в частности наблюдаемой картине рентгеновской дифракции. У. Астбери предложил новую трактовку $\alpha \rightleftharpoons \beta$ -перехода, основанную на следующем представлении об α - и β -формах. β -Форма представлялась в виде параллельных вытянутых пептидных цепей, соединенных между собой водородными связями. Главными рефлексами в рентгенограммах белков этой формы являются 3,4 Å (меридиональный рефлекс, характеризующий расстояние между аминокислотными остатками в пептидной цепи), 4,5 Å (экваториальный рефлекс, характеризующий расстояние между пептидными цепями в одной плоскости) и 9,5 Å (экваториальный рефлекс, характеризующий расстояние между плоскостями). Для α -формы Астбери предложил ленточную трехостаточную плоскую модель. Боковые цепи в этой структуре альтернируют над и под плоскостью пептидного скелета, группируясь в плотноупакованные треугольные колонки. При такой трактовке α - и β -форм $\alpha \rightleftharpoons \beta$ -переход удовлетворяет следующим экспериментальным данным: длина α -формы действительно составляет половину длины β -формы; рассчитанные плотности обеих форм практически одинаковы и совпадают с экспериментальным значением (1,4 г/см³); изгибы цепи в α -форме повторяются на расстоянии 5,0 Å (средняя длина на один аминокислотный остаток составляет 1,7 Å), что отвечает рефлексу 5,1 Å, наблюдаемому в рентгенограммах белков этой формы; изгибы цепи в α -форме не являются резкими и не приводят к наталкиванию боковых цепей в соответствующих триплетях. Для суперконтракционной формы кератина Астбери предложил ленточную структуру с четырьмя остатками на изгиб.

На основе структурного признака Астбери среди фибриллярных белков выделил группу коллагена. Дифракционная картина белков этой группы отличается от рентгенограмм α -, β - и суперконтракционной форм белков группы k.t.e.f. Наиболее интенсивными рефлексами являются меридиональный 4,7 Å и экваториальный 1,0 Å. Предполагая, что каждый третий остаток коллагена является пролином или оксипролином, Астбери предложил две формы белка с параллельной и антипараллельной направленностью пептидных цепей, связанных между собой водородными связями.

У. Астбери был в числе первых исследователей кристаллов глобулярных белков. Им получены рентгенограммы кристаллического эдестина, альбумина яйца и эксельсина, а также денатурированных белков, приготовленных в виде пленок и волокон. Было показано, что молекулы этих белков в кристалле имеют близкое пространственное строение приблизительно сферической формы. Изучая рентгенограммы

денатурированных белков, он пришел к выводу, что денатурация есть процесс дезорганизации нативной структуры, при которой пептидная цепь изменяет свою конформацию. Исходя из идеи плоских, ленточных форм полипептидных цепей и гипотезы плотной упаковки, Астбери предполагал пространственную структуру глобулярных белков, построенную из набора листов, причем в каждом листе полярные боковые группы находятся по одну сторону плоскости листа, а неполярные – по другую. Далее предполагалось, что плоские листы полипептидных цепей взаимодействуют между собой, образуя сандвичевые структуры. Среднее расстояние между плоскостями листов составляет около 10 Å, а расстояние между осями пептидных цепей в одной плоскости – около 4,5 Å. Основанием для такого представления о структуре глобулярных белков послужили появившиеся к тому времени данные о наличии белковых субъединиц у альбумина яйца и гемоглобина. В рентгенограммах фибриллярных белков и специально обработанных денатурированных глобулярных белков Астбери находил много общего, из чего он делал вывод об аналогичном характере пространственного строения белков в двух состояниях. У. Астбери писал, что "...все белки на некоторой стадии их существования являются фибриллярными в молекулярном смысле" и еще: "...два наиболее стабильных и нестероидных состояния белковой структуры, волокнистое и денатурированное, основываются на фундаментально подобных видах молекулярной организации; денатурированное состояние является в основном фибриллярным состоянием, поскольку оно всегда представляет собой полностью вытянутые пептидные цепи, организованные после коагуляции в параллельные пакеты, как в фиброине шелка, β -кератине, β -миозине и β -фибриногене" [27. С. 502]. Замечательны здесь не столько предложенные Астбери конкретные модели фибриллярных, глобулярных и денатурированных белков, а высказанная им впервые идея общности их молекулярной пространственной организации.

Астбери был пионером в изучении структуры синтетических полипептидов, используя для этого рентгеноструктурный анализ и инфракрасные спектры поглощения. Как только Р. Вудвордом и К. Шраммом [28] был разработан доступный метод синтеза полипептидов, Астбери взялся за изучение их структуры и уже в 1948 г. опубликовал работу по анализу рентгенограмм и колебательных спектров полиглицина, полиизолейцина и полипептидов с чередующимися остатками Gly-Ala, Gly-Phe и Ile-Phe [29]. Он отметил сходство рентгенограмм и, следовательно, строения полипептидов и фибриллярных белков.

Подводя итог фундаментальным исследованиям Астбери, следует прежде всего отметить, что в них впервые на большом числе объектов показано, что полипептидные цепи белковых молекул скручены или уложены строго определенным образом. Результаты его исследований и развитые им представления послужили основой последующей расшифровки структур биополимеров. Он первым осознал, что молекулярная биология имеет дело прежде всего со структурами биологических макромолекул, изучение которых необходимо для понимания принципов функционирования клеток и организмов. В 1951 г. Астбери писал:

"Название "молекулярная биология" ныне, видимо, входит в довольно широкое употребление. Я радуюсь этому, поскольку, хотя едва ли впервые изобрел его, горжусь им и давно уже пытаюсь его популяризировать. Оно имеет в виду не столько методику, сколько подход — подход с точки зрения так называемых фундаментальных наук с ведущей идеей поиска на уровне ниже крупномасштабных явлений классической биологии для выявления соответствующего им молекулярного плана. Молекулярная биология занята прежде всего изучением форм биологических молекул и эволюций, функциями и совершенствованием этих форм по мере движения ко все более высоким и сложным уровням организации. Молекулярная биология в своем существе трехмерна и структурна, что не означает, будто бы она простое уточнение морфологии. Она должна исследовать генезис и функцию." [30. С. 3–4].

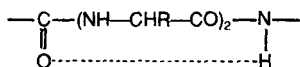
Как уже отмечалось, Астбери предложил большое число молекулярных моделей белков. Хотя ни одна из них не была подтверждена последующими экспериментами, тем не менее его работы оказали огромное стимулирующее влияние на развитие этой области. Условия, которым должны были удовлетворять предложенные им структуры, еще не носили строго количественного характера. Это касается длин связей, валентных углов и конфигурации пептидной группы (во многих моделях Астбери она не была плоской). Ученый хотя и предполагал наличие водородных связей между пептидными единицами, например в β -форме, однако он не сформулировал тезис об образовании связи $N-H...O=C$ как общий принцип формирования структуры полипептидной цепи и не ставил условие полной насыщенности структуры водородными связями. У. Астбери говорил о необходимости плотной упаковки полипептидных цепей, но и это требование носило скорее декларативный характер, поскольку никаких количественных критериев им введено не было. Это и не могло быть сделано, так как в то время не только отсутствовали данные о геометрических параметрах пептидов и белков, но еще не было известно химическое строение ни одного белка.

Следующий крупный шаг в развитии представлений о пространственном строении пептидных биополимеров был сделан М. Хаггинсом [31, 32]. Прежде всего Хаггинс сформулировал количественные геометрические критерии, которым должны удовлетворять модели пептидных цепей белков. На основе результатов рентгеноструктурных исследований Р. Кори [33–38] простейших соединений М. Хаггинсом были приняты для пептидных групп всех моделей единые значения длин связей и валентных углов. Наиболее предпочтительным для пептидной группы Хаггинс считал плоское состояние, причем *транс*- и *цис*-конфигурации предполагал эквивалентными. Однако в некоторых своих моделях он отступал от этого критерия, допуская нарушение плоского строения группы до 30° . Хаггинс предполагал эквивалентность конформационных состояний всех пептидных единиц в белковой цепи, за исключением различий, связанных с боковыми цепями аминокислотных остатков, которые он считал несущественными. Он был первым, кто придал решающее значение водородной связи в формировании структуры полипептидов. Он прямо указывал на то, что водородная

связь является главной "упаковочной силой". Поэтому все предложенные им структуры были полностью насыщены водородными связями между группами N-H и C=O пептидного остова в предположении длины N...O, равной $2,85 \pm 0,05 \text{ \AA}$. Следует отметить, что к началу 1940-х годов концепция водородной связи стала необычайно популярной. Это объясняется тем, что к этому времени благодаря широкому распространению в химии спектральных методов исследования, особенно инфракрасных спектров поглощения, водородные связи были обнаружены в огромном числе органических соединений, содержащих группы CO, OR, OH, NH и др. Присутствие водородных связей N-H...O=C в белках впервые нашло спектральное подтверждение в работах [39, 40].

Удовлетворять отмеченным выше геометрическим критериям могли только спиральные структуры полипептидной цепи, поэтому Хаггинс предложил спиральное строение полипептидов. Оказавшаяся столь плодотворной идея спиральности молекулярных структур биополимеров впервые была высказана им в 1942 г. [31]. Лишь для фиброина шелка и β -кератина Хаггинс, в согласии с Мейером, Марком и Астбери, допускал плоскую форму цепи. Для различных фибриллярных белков им было предложено большее число спиральных структур, существенно отличающихся от ленточных структур У. Астбери. М. Хаггинс разработал модель пептидной цепи, которая включала в качестве основного структурного элемента семичленный цикл, замыкаемый водородной связью. Непрерывное повторение в цепи этого элемента при сохранении нормальных значений валентных углов и плоской конфигурации пептидных групп приводит к неплоской структуре полипептида с винтовой осью второго порядка. Такая структура должна давать в рентгенограмме слабый рефлекс $5,0 \text{ \AA}$ и сильный $2,5 \text{ \AA}$, что, однако, противоречит наблюдаемой дифракционной картине. Модель с неплоской пептидной группой и периодом идентичности $5,0 \text{ \AA}$, содержащая семичленные циклы, имеет винтовую ось симметрии третьего порядка. Она была предложена Хаггинсом для α -кератина; структура приблизительно вдвое короче плоской, вытянутой цепи β -кератина. В волокнах α -кератина отдельные спирали соединяются между собой в слои посредством дисульфидных мостиков и за счет взаимодействия боковых цепей. М. Хаггинс показал, что плоская ленточная структура α -кератина У. Астбери с тремя остатками на изгиб не удовлетворяет экспериментальным геометрическим параметрам и реализоваться не может.

М. Хаггинсом, а несколько ранее Г. Тейлором [41] была предложена спираль с винтовой осью третьего порядка (3_{10}), содержащая 10-членные циклы, замыкаемые водородными связями N-H...O=C типа $4 \rightarrow 1$.



Структурный элемент спирали 3_{10} , как было обнаружено позднее, встречается в конформациях глобулярных белков. Он был назван

β -изгибом, поскольку осуществляет поворот пептидной цепи приблизительно на 180° .

Оценивая значение работ Хаггинса в изучении пространственной организации пептидов и белков, необходимо отметить следующее: во-первых, он впервые ввел количественные геометрические критерии, которым должна удовлетворять любая молекулярная модель полипептидной цепи; во-вторых, обратил внимание на большую роль водородной связи $N-H \cdots O=C$ в формировании пространственного строения пептидного скелета; в-третьих, постулировал насыщенные водородными связями спиральные структуры. В то же время многочисленность предложенных Хаггинсом структур указала на недостаточность предъявляемых к ним геометрических требований и на неоднозначность интерпретации рентгенограмм. Исследования Хаггинса свидетельствовали о необходимости привлечения дополнительных экспериментальных данных и разработки новых подходов к расшифровке картин рентгеновской дифракции от волокнистых и кристаллических белков.

В 1930-годы были получены первые данные о рентгеновском рассеянии кристаллов ряда глобулярных белков: пепсина (Дж. Бернал, Д. Кроуфут) [42], эдестина, альбумина яйца и эксельсина (У. Астбери, С. Дикинсон, Ф. Бейли) [24, 43], инсулина (Д. Кроуфут) [44, 45], химо-трипсина и метгемоглобина (Дж. Бернал, И. Фанкухен, М. Перутц) [46], лактоглобулина (Д. Кроуфут, Р. Райли) [47]. В результате стали известны ориентировочные размеры, форма, симметрия и молекулярная масса белков, размеры элементарных ячеек кристаллов, а также вероятное количество молекул в ячейке. На основе рентгенограмм инсулина, лактоглобулина и метгемоглобина были построены паттерсоновские проекции межатомных векторов. Д. Ринч предприняла попытку связать особенности паттерсоновских проекций со структурой белков [48, 49]. Она предположила несколько гипотетических моделей, в которых пептидные цепи белков свернуты таким образом, что образуют замкнутые правильные многогранники различных размеров с определенным целым числом аминокислотных остатков. Многогранники могут представлять собой призмы, октаэдры и т.д., в предельном случае вырождаться в плоскую сетку с замкнутыми полипептидными цепями. Циклольная гипотеза Ринч была скептически встречена отчасти в силу ее искусственности, а главным образом потому, что имеющиеся в то время данные по рентгеновскому рассеянию кристаллов глобулярных белков еще не могли быть надежно связаны с молекулярной структурой. Для этого прежде всего необходимо было решить проблему фаз рентгеновских рефлексов. При известных фазах и интенсивностях рефлексов могли быть построены проекции распределения электронной плотности и выяснены детали атомной организации структуры. Но это было делом будущего.

Как уже отмечалось, в 1947 г. Вудвордом и Шраммом был открыт эффективный метод синтеза полипептидов [28]. Вскоре К. Бэмфорд, У. Ханби и Ф. Хэппи разработали метод приготовления высокоориентированных пленок синтетических полипептидов большой молекулярной массы [50]. С этого времени начинается интенсивное изучение

структуры гомополипептидов – ближайших искусственных аналогов белка. Е. Амброзе, У. Ханби, А. Эллиотт и Р. Темпл впервые использовали инфракрасные спектры поглощения в поляризованном свете для выяснения ориентаций связей N–H и C=O в поли-γ-метил-*L*-глутамате [51, 52]. Дихроичный спектр в областях 3300–3050 и 1650 см⁻¹, где связи N–H и C=O имеют характеристические полосы поглощения, показал, что в свободном, нерастянutom образце такие связи направлены параллельно оси пептидной цепи. При продольном растяжении образца отношение интенсивностей поляризованных полос поглощения N–H- и C=O-групп сильно меняется, что свидетельствует о переориентации этих связей, которые становятся теперь перпендикулярными оси цепи. Е. Амброзе и соавт. [52] исследовали также поляризованные спектры α-кератина из среза иглы дикобраза, β-кератина из среза пера лебедя и свободные и растянутые высокоориентированные пленки миозина и тропомиозина. Во всех случаях была обнаружена аналогия со спектрами поли-γ-метил-*L*-глутамата. Спектры нерастянутых образцов α-кератиновой группы имели интенсивное поглощение N–H- и C=O-групп при параллельной оси поляризации света и слабое – при перпендикулярной. В спектрах β-кератина и растянутых пленок миозина наблюдалась обратная картина. Полученные результаты поставили под сомнение как ленточную трехстаточную структуру α-кератина, предложенную Астбери, так и спиральную структуру с винтовой осью третьего порядка Хаггинса, которые должны были давать в поляризованном свете малый дихроизм полос NH и CO. Для α-формы фибриллярных белков Амброзе предложил ленточную структуру со свернутой в семичленные циклы цепью с двумя аминокислотными остатками на изгиб. Связи N–H и C=O в этой структуре ориентированы преимущественно параллельно оси цепи.

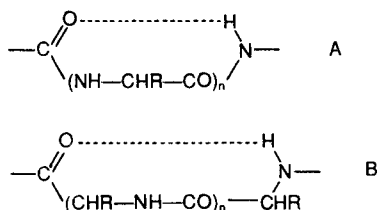
Такую же модель независимо предложили в 1947 г. Г. Цан и в 1948 г. Т. Шиманучи и К. Мидзусима [53–55]. Она отличалась от ранее предложенной аналогичной структуры Хаггинса тем, что в ней связи C^α–N нависают над семичленными циклами (расположены аксиально), а боковые цепи аминокислотных остатков направлены в сторону, т.е. расположены экваториально. В структуре Хаггинса имеет место противоположная относительно цикла ориентация связей C^α–N и C^α–C^β. Однако модель Амброзе, Цана и Мидзусимы, как и модель Хаггинса, не удовлетворяет эксперименту, так как может испытывать лишь вдвое меньшее, чем наблюдается в опыте, удлинение при переходе от α-формы к полностью вытянутой β-форме.

Интересные результаты были получены К. Бэмфордом и соавт. [50] при рентгеноструктурном исследовании ориентированных волокон и пленок поли-γ-метил-*L*-глутамата и некоторых других синтетических полипептидов. Было показано, что гомополипептиды, как и фибриллярные белки, могут существовать в двух формах – свернутой (α) и вытянутой (β) – и подвергаться аналогичному обратимому $\alpha \rightleftharpoons \beta$ -переходу. По мнению Бэмфорда, α-форма представляет собой ленточную структуру с двумя остатками на изгиб, а β-форма – полностью

вытянутую пептидную цепь. В этой работе впервые обращено внимание на важную роль в формировании структуры среды, из которой регенерируется полипептид. Показано, например, что муравьиная кислота благоприятствует образованию β -модификации, а метакрезол — α -модификации поли- γ -метил-*L*-глутамата.

В 1950 г., за несколько месяцев до опубликования серии исследований Л. Полинга и Р. Кори, появилась большая работа Л. Брэгга, Дж. Кендрью и М. Перутца [56], которая как бы подвела черту под структурными исследованиями белков и полипептидов начального периода. В этой работе анализируются структурные модели Астбери, Хаггинса, Цана и других авторов и предлагается ряд новых моделей. Однако, по-прежнему, речь идет о возможных типах укладки основной пептидной цепи. Авторы также рассматривают свои первые результаты рентгеноструктурного изучения гемоглобина и миоглобина. При анализе возможных структур пептидного остова Брэгг, Кендрью и Перутц принимают геометрические параметры пептидной группы, близкие к параметрам Хаггинса и согласующиеся с более поздними данными Кори. Так, длина связи $C^{\alpha}-C'$ считается равной 1,52 Å, $C'-N$ — 1,36 Å и $C'=O$ — 1,24 Å. Валентные углы при атоме C^{α} приняты тетраэдрическими ($109^{\circ}28'$), а при атоме N — или тетраэдрическими, или тригональными (120°). Длина водородной связи $N-H\cdots C=O$ составляет 2,85 Å. Ее направленность строго не лимитируется, но авторы по мере возможности стремятся к линейному расположению связей $N-H$ и $C=O$. Л. Брэгг, Дж. Кендрью и М. Перутц приняли постулат М. Хаггинса о спиральной симметрии полипептидной цепи с целочисленным порядком винтовой оси, но отвергли его второй постулат о том, что каждый элемент основной цепи должен находиться в одинаковых отношениях с соседними элементами (принцип эквивалентности). Так же как и Хаггинс, они придают огромное значение водородной связи $N-H\cdots C=O$ в формировании структуры основной цепи и считают наиболее стабильными только те из них, которые полностью насыщены ими. Предложенная авторами классификация спиральных структур является общепризнанной и в настоящее время [56]. В основу ее положено разделение структур по симметрии пептидного остова и размеру циклов с водородными связями.

Согласно первому принципу, цепи могут обладать винтовой осью симметрии 2, 3, 4 и более высокого порядка. Винтовая ось обозначается символом *S*. Все возможные кольца с водородными связями идентифицируются числом входящих в них атомов. Кольца могут быть двух типов — А и В.



Количество атомов в кольцах типа А определяется формулой $R = 3n + 4 = 7, 10, 13, \dots$, а типа В — $R = 3n + 5 = 8, 11, 14, \dots$. Таким образом, спиральная структура может быть обозначена символом S_R , где S — порядок винтовой оси, а R — число атомов в водородно-связанном цикле. Однако это обозначение неоднозначно. Структуры с одинаковыми обозначениями S и R могут отличаться частотой реализации водородных связей вдоль цепи. В связи с этим в идентификатор спиральной структуры вводится дополнительное обозначение $1/q$, характеризующее степень насыщенности структуры водородными связями ($S_R \cdot 1/q$). Первая структура будет полностью определяться обозначением 2_7 , вторая — $2_7 \cdot 1/2$, третья — $2_7 \cdot 1/3$.

Количество формально возможных спиральных конформаций пептидной цепи оказывается весьма большим. Хотя многие из них являются нереальными по стерическим причинам, тем не менее это количество остается внушительным. Л. Брэгг, Дж. Кендрию и М. Перутц касаются лишь структур, полностью насыщенных водородными связями, интуитивно полагая, что они отвечают минимальной свободной энергии и, следовательно, наиболее вероятны. Авторы подробно анализируют эти структуры и отмечают, в какой степени они согласуются с известными экспериментальными данными и прежде всего с данными рентгеноструктурного анализа. Среди большого числа структур отметим спираль 4_{14} с четырьмя аминокислотными остатками на виток и водородной связью между двумя пептидными группами, разделенными тремя остатками.

Л. Брэгг, Дж. Кендрию и М. Перутц сформулировали важную гипотезу о родственном строении белков, представляющую собой дальнейшее развитие взглядов У. Астбери и М. Хаггинса и получившую широкое распространение в последующих структурных исследованиях белков. Они пишут: "Нельзя полагать с определенностью, что полипептидная цепь имеет одинаковую конформацию во всех кристаллических (т.е. глобулярных) белках или что подобная конформация реализуется в фибриллярных белках, таких, как α -кератин. Однако вполне вероятно ожидать, что гемоглобин и миоглобин содержат цепи одинакового типа, так как эти белки в некотором отношении являются родственными; более того, интервалы идентичности, межцепочечные расстояния и число остатков в интервале подобны в этих двух белках соответствующим характеристикам α -кератина" [56. С. 356]. Авторы имели определенные основания для того, чтобы сделать такое важное заключение. К этому времени ими были получены рентгенограммы кристаллов гемоглобина и миоглобина с огромным числом рефлексов. Хотя их полная интерпретация еще не могла быть выполнена, тем не менее удалось сделать ряд ценных наблюдений. Оказалось, что структуры гемоглобина и миоглобина состоят из участков с заметно различающейся плотностью атомов. Участки с большей плотностью имеют цилиндрическую форму, рентгеновское рассеяние от которых, как и в α -кератине, отвечает рефлексу $5,1 \text{ \AA}$. Рассмотрев большое количество структур полипептидной цепи, как новых, так и предло-

женных ранее, Брэгг, Кендрию и Перутц заключают: "Модели, к которым мы пришли, не имеют очевидных преимуществ перед другими альтернативами" [56. С. 357]. Констатация многообразия предложенных пептидных структур и вывод об отсутствии надежных критериев их выбора правильно характеризовали ситуацию, сложившуюся накануне выхода работ Полинга и Кори.

1.2. МОДЕЛИ ПОЛИПЕПТИДОВ ПОЛИНГА И КОРИ

Первое краткое сообщение о результатах исследования Полингом и Кори пространственной структуры полипептидов и белков появилось в ноябре 1950 г. [57]. В апреле следующего года в одном номере журнала было опубликовано сразу восемь работ Полинга и Кори с подробным изложением полученных результатов, а вскоре появились еще четыре их работы [58—65]. Они сразу же обратили на себя внимание научной общественности, вызвали огромный резонанс и оказали сильное влияние на последующее развитие молекулярной биологии и прежде всего исследований пространственной структуры пептидов и белков. В связи с чем вполне обоснованно разделить исследования, проводимые в этой области, на работы до 1951 г. и последующего периода. Читая какой-либо труд, посвященный структуре пептидов, можно, не зная даты публикации, почти наверняка определить, написан ли он до или после появления в печати работ этих ученых. Исследования Полинга и Кори (1951 г.) имеют теоретический характер. Сделанные авторами предсказания возможных структур полипептидной цепи основаны на следующих постулатах: 1) приняты одинаковые значения для длин связей и валентных углов всех пептидных групп полипептидной цепи. В литературе они получили название геометрических параметров Полинга—Кори; 2) пептидная группа считалась плоской. Возможны две плоские конфигурации группы, отличающиеся взаимным расположением связей $N-H$ и $C=O$, *цис*- и *транс*-переход между ними связан с преодолением высокого потенциального барьера (~20 ккал/моль). При построении моделей Полинг и Кори отдали предпочтение *транс*-конфигурации пептидной группы. По оценке Р. Кори и Дж. Донахью, отклонение от плоского строения группы на 10° вызывает повышение энергии приблизительно на 1,5, а на 30° — на 6 ккал/моль [66]; 3) предполагалась полная насыщенность полипептидной цепи водородными связями. Для водородной связи $N-H...O=C$ были приняты следующие геометрические и энергетические оценки: расстояние $N...O$ считалось равным 2,8 Å, максимальное отклонение от линейности $N-H...O$ не должно превышать 30° и энергия связи — 8,0 ккал/моль; 4) при построении моделей пептидной цепи выбирались наиболее благоприятные ориентации пептидных групп, разделенных атомом C^α , с учетом потенциалов внутреннего вращения вокруг связей $C^\alpha-N$ и $C^\alpha-C'$ и ван-дер-ваальсовых контактов между атомами; 5) конформационные состояния всех звеньев пептидной цепи считались эквивалентными.

Рассмотрев предложенные ранее структуры полипептидов, Полинг и

Кори нашли, что все они не удовлетворяют приведенным требованиям и должны быть отвергнуты. Авторы предложили две новые структуры (α и γ) и структуру складчатого листа (β). Как известно, до работ Полинга и Кори было разработано большое число молекулярных моделей полипептидов, а Брэгг, Кендрию и Перутц проанализировали этот вопрос в общем виде и как будто предусмотрели все возможные варианты. Как же в таких случаях удалось предложить совершенно новые структуры? Это объясняется двумя обстоятельствами. Одно из них связано с более жесткими требованиями, предъявленными Полингом и Кори к геометрии полипептидов; другое, сыгравшее решающую роль, — с предположением о реализации спиралей с нецелочисленными винтовыми осями симметрии. Во всех предпринимавшихся ранее поисках структур полипептидов использовались элементы симметрии атомных и низкомолекулярных кристаллов. В этом случае винтовые оси, действительно, могут быть только целочисленными. По отношению к отдельной макромолекуле требование, чтобы спираль содержала только целое число аминокислотных остатков на виток, не может быть оправдано соображениями физического порядка. Использование до Полинга и Кори целочисленных винтовых осей — результат автоматического перенесения кристаллографического принципа симметрии на спиральные полимерные объекты, т.е. в область, где он не работает.

Рассмотрим структуры, предложенные Полингом и Кори.

α -Спираль. Структура характеризуется следующими параметрами: высота витка $5,4 \text{ \AA}$, проекция остатка на ось $1,5 \text{ \AA}$, период идентичности $27,0 \text{ \AA}$, в который входят 18 аминокислотных остатков. Таким образом, в одном витке α -спирали находится 3,6 остатка; совмещение остатков происходит при повороте на 100° и перемещении вдоль оси на $1,5 \text{ \AA}$. Все пептидные группы соединены между собой водородными связями типа $5 \rightarrow 1$, при котором группа $\text{C}=\text{O}$ i -го остатка связана с $\text{N}-\text{H}$ -группой $(i+4)$ -го остатка. В замыкаемый водородной связью цикл входят 13 атомов. В номенклатуре Брэгга, Кендрию и Перутца α -спираль имеет обозначение $3,6_{13}$. Таких спиралей может быть две: с правым и левым направлениями закрутки. У полиглицина правая и левая α -спирали эквивалентны. Во всех остальных случаях разное направление закрутки приводит к различной ориентации боковых цепей относительно пептидного остова. Вопрос о том, какая из α -спиралей более стабильна, Полингом и Кори решен не был.

γ -Спираль. Этот вид спирали содержит 5,1 аминокислотного остатка на виток с высотой витка $5,0 \text{ \AA}$ и проекцией остатка на ось $0,9 \text{ \AA}$, имеет водородную связь типа $7 \rightarrow 1$, которая замыкает кольцо из 19 атомов ($5,1_{19}$).

β -Структура складчатого листа. В течение многих лет предполагалось, что фиброин шелка, фибриллярные белки β -формы и белки группы k.m.e.f. в растянутом состоянии представляют собой вытянутые плоские полипептидные цепи, взаимодействующие посредством водородных связей с соседними цепями, которые находятся в одной плоскости и имеют противоположное направление. Л. Полинг и Р. Кори

показали, что такая плоская антипараллельная β -структура исключается для всех полипептидов, кроме полиглицина, из-за напряжений, возникающих по стерическим причинам между боковыми радикалами соседних цепей. Они предложили структуру складчатого листа, в которой отсутствует перекрывание ван-дер-ваальсовых радиусов атомов и в то же время не нарушается сетка водородных связей. Складчатые листы отдельных пептидных цепей могут образовывать параллельные и антипараллельные β -структуры. Кроме того, одна полипептидная цепь в результате ее систематических изгибов может складываться в так называемую кросс- β -структуру.

Л. Полинг и Р. Кори рассмотрели все возможные конформации в минимумах торсионных потенциалов вращения вокруг связей $C^{\alpha}-N$ и $C^{\alpha}-C'$ и пришли к выводу, что α -спираль и складчатый лист отвечают наиболее предпочтительным ориентациям смежных пептидных групп. Что же касается γ -спирали, то она не оказалась в числе низкоэнергетических структур. При учете только торсионного потенциала эта спираль, по оценке Полинга и Кори, менее стабильна, чем α -спираль, на 2,3 ккал/моль. В отличие от компактной α -спирали, имеющей хорошие ван-дер-ваальсовы контакты, γ -спираль представляет собой более рыхлую цилиндрическую структуру с отверстием около 2,5 Å. Л. Полинг и Р. Кори не только сформулировали требования к геометрии полипептидной цепи и предложили удовлетворяющие им структуры, но и проанализировали имеющийся для белков и синтетических пептидов экспериментальный материал [67—71]. Они пришли к заключению, что α -спираль и β -структура весьма распространены среди фибриллярных и глобулярных белков, а также гомополипептидов. В частности, было предложено, что α -кератин и другие белки этой группы имеют структуры, близкие α -спирали, а β -кератин состоит из слоев складчатого листа, между которыми находятся двойные слои α -спиралей. К суперконтракционной форме кератина и миозина была отнесена γ -спираль. Для коллагена Полинг и Кори предложили трехцепочечную, скрученную в жгут конформацию. В тройной спирали коллагена полипептидные цепи также имеют спиральную форму с меньшим шагом. Из-за большого содержания в коллагене пролина и оксипролина (30%) α - и γ -спирали не могут реализоваться по стерическим причинам и из-за отсутствия многих водородных связей. Поэтому для единичных цепей коллагена предложена спираль с винтовой осью 9-го порядка.

Л. Полинг и Р. Кори рассмотрели конформации пептидных цепей в гемоглобине и миоглобине. Ранее Перутц и Кендрию установили, что эти белки содержат участки повышенной плотности, которые имеют очертания стержней [72, 73]. Они предположили, что стержни обладают той же структурой, что и α -кератин. Л. Полинг и Р. Кори приписали гемоглобину и миоглобину α -спиральное строение и высказали мысль, что такая конформация полипептидной цепи характерна и для других глобулярных белков, т.е. α -спираль имеет фундаментальное значение в пространственной организации белковых молекул.

В то время были получены первые рентгенограммы синтетических полипептидов: поли- γ -метил- и поли- γ -бензил-*D*-глутамата, и изучены их

дихроичные инфракрасные спектры. Л. Полинг и Р. Кори показали, что эти экспериментальные данные полностью отвечают α -спирали.

Подводя итог циклу работ Полинга и Кори, можно отметить следующее. 1. Были четко сформулированы геометрические требования к полипептидной цепи, в основу которых положены экспериментальные данные о геометрических параметрах амидов и простейших пептидов, водородной связи $N-H\cdots O=C$, а также представление об электронном строении пептидной группы, следующих из первых квантовохимических расчетов. 2. Для своего времени Полинг и Кори наиболее детально учитывали условия упаковки полипептидной цепи, считая стабильными те конформации, которые отвечали минимумам торсионных потенциалов. Тем самым косвенно учитывались невалентные взаимодействия атомов, так как торсионные потенциалы не противоречат атом-атомным потенциалам ван-дер-ваальсовых взаимодействий. 3. Для полипептидной цепи предложен ряд структур, среди которых выделены в качестве самых стабильных α -спираль и β -складчатый лист. Позднее стали ясны причины уникальности этих структур. В α -спирали и β -складчатом листе имеет место полная согласованность между всеми видами взаимодействий. Они являются оптимальными не только с точки зрения стопроцентной реализации пептидных водородных связей, на что прежде всего обращали внимание Полинг и Кори, но отвечают также наилучшим условиям невалентных взаимодействий атомов пептидного остова и минимумам торсионных потенциалов. Структуры Полинга и Кори удовлетворяли наблюдаемым картинам рентгеновской дифракции, поляризованным инфракрасным спектрам, равенству плотностей α - и β -форм, объясняли эластичные свойства фибриллярных белков и полипептидов, т.е. обратимый $\alpha \rightleftharpoons \beta$ -переход; 4. Л. Полинг и Р. Кори, проанализировав опытный материал, касающийся пространственного строения белков и синтетических полипептидов, пришли к выводу об их структурной общности.

Таким образом, предположение, впервые высказанное Астбери, поддержанное Хаггинсом, а также Брэггом, Кендрию и Перутцем, о том, что структуры фибриллярных и глобулярных белков и синтетических полипептидов могут быть описаны с помощью ограниченного набора канонических форм-блоков, получило в работах Полинга и Кори подтверждение и дальнейшее развитие. Еще более укрепилось представление о водородной связи как о главном факторе, формирующем структуру белка.

Структуры Полинга и Кори, как отмечалось выше, удовлетворяли всем известным в то время экспериментальным данным, в частности рентгеновской дифракции. Однако этим же данным не противоречили и многие другие, ранее предложенные структуры. Интересно то обстоятельство, что сразу же после работ Полинга и Кори был обнаружен ряд новых экспериментальных фактов, которые согласовывались с предложенными ими моделями и противоречили всем остальным. Наиболее сильным доводом в пользу α -спирали явились наблюдение и интерпретация Перутцем меридионального рефлекса $1,5 \text{ \AA}$ [74]. Первоначально

его открыл еще в 1943 г. И. Макаптур в рентгенограмме α -кератина [75]. Однако ни сам автор, ни другие исследователи не придали этому наблюдению серьезного значения. М. Перутц обнаружил такой рефлекс в дифракционных картинах многих синтетических полипептидов и α -форм фибриллярных белков. Рефлекс $1,5 \text{ \AA}$ получается за счет дифракции рентгеновских лучей от плоскостей, проходящих перпендикулярно оси волокна через аминокислотные остатки, образующие спираль. Интервал чередования остатков, т.е. проекция каждого остатка на винтовую ось α -спирали 3,6, равен $1,5 \text{ \AA}$. Таким образом, этот рефлекс точно отвечает только α -спирали и никакой другой структуре. Он был найден в дифракционных картинах поли- γ -метил- и поли- γ -бензил-*L*-глутамата, α -кератина, миозина, тропомиозина, эпидермина и ряда других фибриллярных белков α -формы, а также гемоглобина и миоглобина.

Дальнейшее доказательство реализации α -спирали в синтетических полипептидах было получено У. Кокраном и Ф. Криком [76, 77]. Авторы развили общую теорию дифракции рентгеновских лучей на спиральных структурах. Она упростила количественные сравнения предсказанных и опытных данных и позволила получать непосредственно из наблюдаемой рентгенограммы значения спиральных параметров: n — число остатков на виток и h — высоту витка. Значения n и h , найденные авторами для поли- γ -бензил-*L*-глутамата, точно совпали с параметрами α -спирали (18 остатков в 5 витках протяженностью вдоль оси $27,0 \text{ \AA}$).

При обсуждении α -спирали Полинг и Кори сравнивали радиальные распределения интенсивности рассеяния рентгеновских лучей, рассчитанные для спирали (включая атомы C^{β}), с экспериментальной функцией распределения, полученной для гемоглобина. Хорошее совпадение теоретических и опытных данных указывало на преобладание α -спиралей в гемоглобине. Подобное доказательство вскоре было приведено Д. Райли и Ю. Арндтом при изучении функции распределения интенсивности рассеяния рентгеновских лучей сывороточным альбумином [78]. Здесь совпадение оказалось еще более бесспорным, что позволило сделать вывод о значительном содержании и в этом глобулярном белке α -спиралей.

Результаты, полученные при использовании других методов исследования пространственного строения, также неизменно подтверждали правильность α -спирали. Новые данные по инфракрасному дихроизму полипептидов А. Эллиотта, У. Прайса и Р. Фразера полностью согласовывались с моделью пептидной цепи, в которой водородные связи $N-H \cdots O=C$ ориентированы приблизительно параллельно оси [79—81]. Способность фибриллярных белков группы k.m.e.f. вдвое увеличивать свою длину хорошо отвечала 122%-й растяжимости α -спирали при ее переходе к β -структуре складчатого листа [82].

Очень скоро большинство исследователей пришли к выводу, что α -спираль является основой структуры α -форм фибриллярных белков и синтетических полипептидов. При интерпретации рентгеновских данных, касающихся α -кератина, возникли, однако, некоторые трудности,

преодоление которых привело к уточнению структуры этого белка. Одна из главных особенностей рентгенограммы α -кератина заключается в наличии интенсивного меридионального рефлекса $5,2 \text{ \AA}$. Нормальная α -спираль, например, поли- γ -бензил-*L*-глутамата дает рефлекс $5,4 \text{ \AA}$ с небольшим смещением максимума от меридиана. Различие в двух случаях в расстоянии между соответствующими слоевыми плоскостями и в положении максимумов интенсивности рассеяния были почти одновременно и независимо объяснены Криком [83] и Полингом и Кори [84] систематической деформацией единичных α -спиралей в α -кератине. Она вызвана свертыванием α -спиралей в жгут, т.е. образованием суперспирали. Ф. Крик показал, что свертывание единичных спиралей возникает за счет эффективной упаковки белковых цепей. Он обсудил геометрические аспекты взаимодействия белковых цепей и описал две структуры α -кератина с двумя и тремя нитями в жгуте. Л. Полинг и Р. Кори предложили для α -кератина скрученную структуру из семи свернутых в α -спираль цепей.

Первое систематическое изучение стабильности спиральных структур было предпринято в 1953 г. Донахью, который использовал несколько измененные стереохимические критерии Полинга и Кори и учел при построении спиралей энергию дестабилизации, вызванную отклонением длин связей и валентных углов от стандартных значений [85]. Помимо α - и γ -спиралей Донахью проанализировал четыре других спиралей с энергией деформации меньше $3,0$ ккал на аминокислотный остаток, а именно $2,2_7$, $3,0_{10}$ и $4,4_{16}$ (π -спираль, предложенная Б. Лоу [86]). Среди них самой предпочтительной, по Донахью, оказалась α -спираль.

С увеличением размера боковых цепей аминокислотных остатков расстояние между осями спиралей увеличивается, структура полипептида становится менее упорядоченной и качество рентгенограмм падает. Особое значение для определения ориентации боковых цепей и решения вопроса о стабильности правой и левой α -спирали имело изучение рентгеновского рассеяния поли-*L*-аланином, где можно было надеяться получить полное соответствие между структурой и рентгенограммой. Ориентировочный образец поли-*L*-аланина в свободном и растянутом состояниях, а также при повышенной влажности был изучен Бэмфордом и соавт. [87]. Полученные четкие рентгенограммы точно соответствовали картине рентгеновской дифракции или α -спирали (для свободного полимера) или β -структуры (для растянутого полимера или при повышенной влажности). Поли-*L*-аланин оказался первым синтетическим полипептидом, для которого удалось наблюдать две конформации основной цепи. Свободный образец дает интенсивные меридиональные рефлексы $5,4$ и $1,5 \text{ \AA}$, отвечающие α -спирали, атомы C^α которой располагаются на окружности с радиусом $2,3 \text{ \AA}$.

Если ограничиться *L*-полипептидами, то можно построить две спиральные структуры с противоположным направлением винтовой оси: правую и левую. Для полиглицина обе спиралы зеркально-симметричны и, следовательно, изоэнергетичны. При наличии атомов C^β зеркальная

симметрия нарушается и спирали становятся энергетически неэквивалентными из-за различной упаковки боковых цепей и их ориентации относительно пептидного остова. Первую попытку решить вопрос о предпочтительности правой или левой закрутки спирали предприняли в 1956 г. Л. Браун и И. Троттер [88]. Располагая оси спиралей в одном направлении, они получили лучшее соответствие рассчитанных и наблюдаемых интенсивностей рефлексов в рентгенограмме поли-*L*-аланина для левой α -спирали. Правильный ответ был получен через три года А. Эллиоттом и Б. Мэлколмом, которые повторили аналогичный расчет, предложив, однако, статистическое распределение направлений спиральных осей вверх и вниз в ориентированном образце поли-*L*-аланина [89]. В результате оказалось, что структура полимера представляет собой правую α -спираль. Вскоре она была обнаружена у многих синтетических полипептидов.

Хотя в 1950-е годы еще не было известно пространственное строение на атомном уровне ни у одного белка, тем не менее в то время почти отсутствовало сомнение в том, что белковые молекулы построены из регулярных форм и главным образом из α -спиралей Полинга и Кори, обнаруженных в чистом виде у гомополипептидов. Именно на таком представлении о строении белков основана классификация белковых структур на первичную, вторичную и третичную, предложенная в 1952 г. К. Линдерстрем-Лангом [90]. Под первичной структурой понималась аминокислотная последовательность белка, т.е. его химическое строение, включая дисульфидные связи; под вторичной структурой — полностью насыщенные пептидными водородными связями регулярные конформации белковой цепи как целого или ее отдельных участков. Набор взаимодействующих между собой регулярных конформаций α -спиралей, β -структур и т.д. образует нативное пространственное строение белковой молекулы, названное Линдерстрем-Лангом третичной структурой. Таким образом, классификация Линдерстрем-Ланга, по существу, представляет собой формулировку принципа пространственной организации белков. Очевидно, разделение пространственной структуры белка на вторичную и третичную является условным и может иметь смысл только в том случае, если пространственное строение макромолекулы действительно представляет собой ансамбль сравнительно немногочисленных канонических форм полипептидов. В то время этот вопрос был далек от своего решения. Позднее иерархия структур Линдерстрем-Ланга пополнилась еще одной, четвертичной, структурой, характеризующей агрегацию белковых молекул или достаточно обособленных субъединиц. Примерами белков с четвертичной структурой могут служить гемоглобин, молекула которого состоит из четырех субъединиц, белок вируса табачной мозаики, представляющий собой систему из 200 одинаковых глобулярных молекул.

Под сильным влиянием α -спиральной концепции К. Линдерстрем-Ланг и Дж. Шеллман предложили в 1954 г. третичную структуру инсулина, состоящую из левой α -спирали цепи А и правой — цепи В [91]. Б. Лоу в 1955 г. построила структурную модель этого белка из

двух левых α -спиралей [92], а Г. Линдли и Дж. Коллетт (1955 г.) — из двух правых α -спиралей [93]. Нарушение спиральной структуры допускалось только в местах образования дисульфидных связей. Три совершенно различные модели, но в равной мере основанные на предположении о максимальном содержании α -спиралей, были предложены для рибонуклеазы — второго белка после инсулина, для которого стала известной аминокислотная последовательность. Гипотетические третичные структуры рибонуклеазы, построенные М. Сета и С. Лифсоном в 1959 г., Г. Шерагой в 1960 г. и Дж. Парксом в 1961 г. [94—96], более чем на 90% состояли из α -спиралей (нарушение спирали допускалось только в случае пролина и дисульфидной связи). Все структуры, предложенные для инсулина и рибонуклеазы в отсутствие кристаллографических данных и информации о действительном α -спиральном содержании, как известно, оказались несостоятельными.

1.3. ПРОСТРАНСТВЕННОЕ СТРОЕНИЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПОЛИПЕПТИДОВ

Начатое незадолго до 1951 г. Астбери, Амброзе, Бэмфордом, Эллиотом и другими изучение пространственного строения синтетических полипептидов получило после опубликования работ Полинга и Кори стремительное развитие. Повышенный интерес к таким соединениям был стимулирован результатами уже первых работ в этой области, которые вселили надежду, что исследование гомополипептидов может существенно помочь в решении одной из основных задач проблемы белка — установлении принципов пространственной организации белковых молекул. Такой оптимизм в то время казался вполне оправданным. Синтетические полипептиды состоят из тех же структурных элементов, что и белки, и, следовательно, конформации тех и других определяются одними и теми же видами взаимодействий. Учитывая одинаковую природу в обоих случаях взаимодействий между валентно несвязанными атомами, можно было полагать, что изучение структуры более простых по химическому строению синтетических полипептидов при относительной легкости целенаправленного моделирования аминокислотного состава, последовательности и длины пептидной цепи поможет выяснить основные факторы, ответственные за формирование пространственного строения белков. Особое значение эти соединения приобрели в связи с обнаруженной общностью между их структурами и структурами природных полипептидов — фибриллярных и глобулярных белков. Первые же исследования показали, что синтетические полипептиды образуют два главных типа структур, аналогичных α - и β -формам кератина, миозина, фиброина шелка и др., которые, как и в случае белков, могут обратимо переходить друг в друга. После работ Полинга и Кори эти формы были интерпретированы как α -спираль и β -структура складчатого листа. Еще более обоснованной стала выглядеть основная, а по существу единственная в то время структурная гипотеза белков, согласно которой их пространственное строение представлялось в виде

различных комбинаций ограниченного числа одних и тех же регулярных форм. Наличие этих форм не только в фибриллярных и глобулярных белках, но и в синтетических полипептидах указывало на большую перспективность конформационных исследований последних. Таким образом, появилось основание считать синтетические полипептиды простейшими структурными аналогами белков. Помимо отмеченного выше, интерес к синтетическим полипептидам вызван и тем, что они, как полагали, являются удобными модельными соединениями в экспериментальном и теоретическом изучении переходов от высокоорганизованной спиральной структуры в беспорядочную клубковую форму. Переход гомополипептидов "одионочная спираль—клубок" представлялся простейшим процессом деструкции полипептидной цепи, имитирующим процесс денатурации макромолекулы белка.

Вначале полипептиды исследовались в виде ориентированных текстурированных пленок и волокон с помощью рентгеноструктурного анализа и поляризованных инфракрасных спектров. Изучались структуры образцов в свободном и растянутом состояниях, при различных температуре и влажности. Образцы получались путем осаждения полимера из раствора с последующей прокаткой (метод Ханби [97]). Было показано, что природа растворителя, из которого выделялся образец, может существенно влиять на структуру твердого полимера. Основные результаты, полученные в начальный период конформационных исследований синтетических полипептидов, были отмечены в разделе 1.2. Последующий за ним период характеризуется большим разнообразием изучаемых полипептидов, рассмотрением их структур не только в твердом состоянии, но и в растворах и, наконец, использованием многих физико-химических и прежде всего спектральных методов анализа. Основные направления исследования синтетических полипептидов касались установления структуры и выяснения влияния на ее стабильность аминокислотного состава и последовательности, длины пептидной цепи, агрегатного состояния и внешних условий — природы растворителя, концентрации, ионной силы, рН и температуры.

Твердые образцы поли-*L*-аланина, поли- γ -метил- и поли- γ -бензил-*L*-глутамата, как уже отмечалось, дают в зависимости от свободного или растянутого состояния полимеров и природы растворителя, из которого они осаждаются, четкую картину рентгеновской дифракции α -спирали или β -структуры. Анализ интенсивностей рефлексов в рентгенограммах убедительно показал предпочтительность правой α -спирали перед левой. В 1957 г. А. Эллиоттом и соавт. [98], Э. Блоутом и соавт. [99, 100] и в следующем году П. Доти и соавт. [101] было обнаружено, что конформации α -спирали и β -структуры может принимать также поли-*L*-лизин, исследованный в виде ориентированной пленки. Полимер испытывает обратимый $\alpha \rightleftharpoons \beta$ -переход, образуя при высокой влажности правую α -спираль, а при низкой — β -структуру. Аналогичный переход наблюдался и у натриевой соли поли-*L*-глутаминовой кислоты [102]. В твердых образцах поли-*L*-валина и поли-*L*-серина обнаружена только β -структура, а поли-*L*-тирозина — α -спираль [103—106].

В середине 1950-х годов начинается интенсивное изучение синтетических полипептидов в растворах. Оно привело к созданию нового раздела физической химии макромолекул и в конечном счете позволило более реалистически оценить сложность структурной проблемы белка. Значительный вклад в эту область внесли пионерские экспериментальные исследования Э. Блоута, П. Доти, Г. Фасмана и М. Гудмана, а также теоретические разработки У. Моффита, Дж. Янга, Дж. Кирквуда и Д. Фиттса, касающиеся оптической активности и кругового дихроизма полипептидов в растворе. П. Доти и соавт., используя кривые дисперсии оптического вращения, впервые установили, что синтетические полипептиды в растворе существуют в виде равновесной смеси регулярной структуры и беспорядочных клубков [107, 108]. В клубковой форме имеет место постоянное изменение (флуктуация) взаимной ориентации всех участков цепи друг относительно друга. Здесь само понятие конформации молекулы, характеризующееся определенными значениями двухгранных углов вращения вокруг одинарных связей, теряет свой смысл. Клубок — это новое, специфическое состояние полипептида, которое может быть описано лишь на основе статистического подхода. На примере поли- γ -бензил-*L*-глутамата в разбавленных растворах было показано, что растворители малой и средней полярности (хлороформ, метакрезол, пиридин) смещают равновесие в сторону α -спиралей, а полярные растворители (дихлоруксусная кислота, гидразин) — в сторону флуктуирующего клубка. Большое содержание α -спирали обнаружено в растворах инертных растворителей у поли-*L*-аланина, поли-*L*-лейцина, поли-*L*-лизина и поли-*L*-метионина [109, 110]. Естественно, наибольший интерес представляли исследования полипептидов в водной среде. П. Доти, Э. Блоут и сотр. (1957—1962 гг.) изучили водные растворы поли-*L*-глутаминовой кислоты и поли-*L*-лизина. Оба полимера являются преимущественно спиральными в тех областях рН, где молекулы нейтральны. При титровании наблюдается переход спираль — клубок, причем в первом случае с ростом рН содержание клубковой формы увеличивается, а во втором — уменьшается. Исследование сополимеров глутаминовой кислоты и лизина вблизи нейтрального значения рН показало увеличение спирального содержания с возрастанием молярной доли фракции лизина до 0,5. Стабилизация α -спирали у обоих полимеров была объяснена электростатическим эффектом, поскольку ни поли-*L*-глутаминовая кислота, ни поли-*L*-лизин не обнаруживают спирали в нейтральной области рН, где они существуют в ионной форме.

Г. Фасман и соавт. исследовали сополимеры глутаминовой кислоты и лейцина в воде [111—114]. Найденное увеличение содержания спиралей с ростом температуры было объяснено спецификой гидрофобных взаимодействий. Особый интерес для выяснения факторов, стабилизирующих α -спираль, имело исследование У. Гратцера и П. Доти поли-*L*-аланина в водном растворе [115]. Данный полимер является самой простой оптически активной белковой моделью. Так как в чистом виде поли-*L*-аланин не растворяется в воде, авторы изготовили образец,

оказавшийся водорастворимым, который включал центральный участок из 175 остатков аланина, окаймленный с обоих концов более чем 300 остатками глутаминовой кислоты. При нейтральном значении pH некоторая часть полимера имела α -спиральную структуру. В связи с тем, что поли-*L*-глутаминовая кислота в этих условиях спирали не образует, обнаруженная спиральная структура была отнесена исключительно к поли-*L*-аланину. Такой результат явился до некоторой степени неожиданным.

Первоначально концепция стабильности α -спирали Полинга и Кори основывалась на предположении о том, что водородная связь является главным, если не единственным, стабилизирующим фактором этой структуры. Как известно, взаимодействия между боковыми цепями, между элементами основной цепи и между боковыми цепями и основной цепью Полингом и Кори не учитывались. Энергия пептидной водородной связи $N-H\cdots O=C$ α -спирали была принята равной $-8,0$ ккал/моль. Определение энергии водородной связи в водной среде привело к существенно меньшему значению. Так, из исследования термодинамических свойств водных растворов мочевины Шеллман оценил энергию водородной связи в $-1,5$ ккал/моль [116]. Более поздние определения И. Клотцем и Дж. Франzenом теплот образования пептидной водородной связи при ассоциации молекул *N*-метилацетамида привели к значениям $-4,0$ ккал/моль в четыреххлористом углероде, $-2,0$ ккал/моль в диоксане и около нуля в воде [117, 118]. Эти данные поколебали представление о пептидной водородной связи как о факторе, оказывающем доминирующее влияние на упаковку пептидной цепи в α -спираль. К этому времени α -спираль была обнаружена в водных растворах у целого ряда полипептидов. Дж. Шеллман и У. Харрингтон [119], а также Дж. Эдсall и Дж. Уиман [120] предположили, что устойчивость α -спирали обусловлена главным образом взаимодействием боковых цепей и поэтому практическое отсутствие стабилизирующего эффекта водородных связей в воде не разрушает спираль. Результаты исследования Гратцера и Доти поли-*L*-аланина в водной среде показали, что и такое объяснение не является бесспорным из-за незначительности в данном случае взаимодействий в α -спирали боковых C^β -метильных групп [115]. Детальное изучение влияния боковых цепей аминокислот на стабильность α -спирали было проведено Фасманом и Блоутом [121]. В частности, установлено, что гомополипептиды валина, изолейцина, серина, треонина, цистеина и пролина в растворах α -спиралей не образуют. Этот результат, однако, нельзя трактовать как невозможность встройки в α -спиральную структуру перечисленных аминокислот.

В 1967 г. Шерага и соавт. показали, что участки цепи, состоящие из остатков валина, могут образовывать α -спираль [122]. Влияние различных эффектов на устойчивость α -спирали было обнаружено Блоутом и соавт. при беспорядочном включении валина в поли-*L*-метионин [123]. Общая тенденция, однако, заключалась в уменьшении спирального содержания смешанного полимера с увеличением доли валиновых остатков, начиная с 10%. Р. Фразер и соавт., изучив серию полипептидов

общей формулы $(G_x - V - G_x)_n$, где G — γ -метил- L -глутамат; V — L -валин; $x = 0, 1, 2, 3$, отметили понижение стабильности α -спирали с уменьшением x [124]. Полимер с 20%-ным составом валина ($x = 2$) не обнаруживал снижения спирального содержания по сравнению с чистым поли- γ -метил- L -глутаматом.

α -Спиральные и β -структурные конформации были найдены у многих сополимеров и полимеров с чередующимся порядком аминокислот. Р. Фразер и соавт. [124, 125] исследовали с помощью рентгеноструктурного анализа ориентированные пленки поли- L -аланилглицина. Авторы получили типичную для β -структуры дифракционную картину, которая ранее наблюдалась для растянутого поли- L -аланина, β -кератина, фиброина шелка и т.д. Аналогичный результат был получен Фразером и соавт. позднее при исследовании влияния включения глицина в поли- γ -этил- L -глутамат [126]. Как и в предыдущем случае, четко наблюдался спиралеразрушающий эффект глицина.

Первые исследования зависимости структуры пептида от молекулярной массы выполнены в 1951 г. в лаборатории Бэмфорда и детально описаны в монографии [127]. Было замечено, что низкая степень полимеризации твердого образца благоприятствует адаптации β -структуры. Низкомолекулярные образцы поли- γ -бензил- L -глутамата в среде слабополярных растворителей, как показали исследования П. Доти и соавт. [128, 129], Э. Блоута и А. Асадуриана [130], существуют в α -, β - и клубковой формах, причем разбавление смещает конформационное равновесие в сторону α -спирали. Полученные из таких сред пленки поли- γ -бензил- L -глутамата имеют спиральную структуру с примесью аморфной части. В полярных растворителях, например в муравьиной кислоте, равновесие смещено в сторону β -структуры, которую принимает твердый полипептид при его выделении из этой среды. Увеличение длины цепи благоприятствует α -форме. Критический для α -спирали размер цепи колеблется от 6 до 20 остатков.

Наиболее детальное и систематическое изучение зависимости α -спирального и β -структурного содержания от длины цепи было выполнено в 1959—1965 гг. Гудманом и соавт. [131—144]. Авторами синтезировано несколько серий олигопептидов с различной длиной цепи и исследованы их физические свойства. Для соединений, состоящих из остатков γ -метил- L -глутамата, α -спираль в среде диметилформамида и метакрезола не была обнаружена вплоть до гексапептида. Начало ее образования наблюдается между гепта- и нонапептидом. В трифторэтаноле содержание α -спирали становится заметным только у нона- γ -метил- L -глутамата. В среде диоксана олигопептиды с числом остатков от 3 до 11 имеют формы с межмолекулярной ассоциацией, отнесенные к β -структуре. Начиная с додекапептида, доля α -спирали быстро растет. Высокомолекулярный полимер в диоксане имеет большее спиральное содержание, чем в диметилформамиде. Олигомеры любой длины в среде дихлоруксусной кислоты находятся в состоянии беспорядочного клубка. Следующая, изученная Гудманом и соавт., серия олигопептидов состояла из остатков β -метил- L -аспартата. В диметилфор-

мамиде пептиды с длиной цепи от двух до шести остатков не содержат регулярных структур; β -структура появляется у октапептида, а α -спираль — у ундекапептида. В смеси хлороформа с дихлоруксусной кислотой β -структура отсутствует, а α -спираль наблюдается, начиная с ундекапептида. Серия аланиновых олигомеров (2—10 остатков в цепи) изучена в трифтор- и дихлоруксусной кислотах и трифторэтаноле. Все соединения в трифторуксусной кислоте имеют форму клубка; в двух других растворителях α -спираль обнаружена только у дека-*L*-аланина.

Э. Блоут и соавт. предприняли в 1962 г. первую попытку найти зависимость между природой аминокислотных остатков гомополипептида и типом наиболее стабильной для него регулярной структуры [145]. Для исключения влияния длины цепи на конформацию авторы исследовали большое число пептидов разной природы с высокой степенью полимеризации. На основе полученных результатов гомополипептиды многих природных α -аминокислот были разбиты на два класса; в один из них вошли соединения, образующие α -спираль, в другие — соединения, образующие β -структуру или беспорядочные клубки. Э. Блоутом была сформулирована конформационная гипотеза, впервые касающаяся взаимосвязи структуры пептидного скелета и природы боковых цепей. Согласно этой концепции, одни природные аминокислоты при включении их в пептидную цепь стабилизируют α -спираль, а другие — дестабилизируют; первые получили название спиралеобразующих, вторые — спираленеобразующих. Э. Блоут указывает на две причины, которые могут вызывать ослабление спирали. Одна из них является стерической и обусловлена невыгодными контактами между спиральной основной цепью и боковыми радикалами, имеющими разветвление при атоме C^β (валин, изолейцин). Вторая причина связана с наличием в боковой цепи γ -гетероатома, который имеет возможность образовывать водородную связь с амидной группой основной цепи (серин, треонин). Эта связь может быть сильной и может конкурировать с внутрицепочечной водородной связью между пептидными группами. Позднее (1966 г.) Г. Оэр и П. Доти предложили класс спиралеобразующих аминокислот разделить на две группы [146]. В первую группу входят аминокислоты с одним алифатическим заместителем при атоме C^β ; соответствующие полипептиды образуют ненапряженные спирали. Во вторую группу были включены все ароматические аминокислоты, полимеры которых образуют менее стабильные спирали из-за стерических затруднений между основной и боковыми цепями. Конформационная гипотеза Блоута положила начало многочисленным поискам простых эмпирических корреляций между аминокислотным составом и спиральным содержанием. Нельзя сказать, что разделение аминокислот по их влиянию на стабильность α -спирали полипептидов серьезно подкреплялось имеющимся экспериментальным материалом. Скорее наоборот, существующие к тому времени опытные данные свидетельствовали об условности предложенной Блоутом конформационной гипотезы. В самом деле, уже был известен целый ряд синтетических полипептидов природных α -аминокислот, которые с большой легкостью совершают переход между α - и β -формами, а также неупорядоченным

клубком. Реализация той или иной конформации полипептида как в твердом состоянии, так и в растворителе зависит от многих факторов. Подбирая соответствующие внешние условия, можно практически всегда наблюдать у данного полипептида или α -спираль, или β -структуру, или клубок, т.е. множество конформаций, или их конформационное равновесие. Все это указывает на тонкую зависимость между конформацией полипептида и природой составляющих его аминокислот и отсутствие доминирующей предпочтительности одной формы. Кроме того, даже в случае гомополипептидов правая α -спираль и β -структура не являются единственно возможными регулярными формами укладки пептидной цепи.

Е. Брэдбери и соавт. исследовали поли- β -бензил-*L*-аспартат в твердом состоянии, выделенный в виде пленки из раствора в хлороформе [147, 148]. В обычных условиях твердый образец имел правую α -спираль. Однако при его нагревании в течение нескольких часов при 170° в вакууме появляется новая форма, имеющая отличную от α -спирали картину рентгеновской дифракции. Характерные для α -спирали меридиональные рефлексы 1,5 и 5,4 Å сместились соответственно к 1,3 и 5,3 Å, а экваториальные рефлексы теперь лучше отвечают не гексагональной упаковке цепей, а тетрагональной. Рентгенограмма поли- β -бензил-*L*-аспартата хорошо согласуется со спиралью 4_{13} , предложенной Брэггом, Кендрию и Перутцем [56]. В одном витке этой спирали, названной ω , укладываются точно четыре остатка, а бензольные кольца боковых цепей располагаются под углом 54° к оси 4-го порядка. У ω -спирали водородные связи нелинейны, а пептидные группы несколько отклоняются от плоской конфигурации. Перекристаллизация образца в хлороформе возвращает структуру к правой спирали. В смеси хлороформа и уксусной кислоты поли- β -бензил-*L*-аспартат имеет форму левой α -спирали. Таким образом, у этого полимера конформационное равновесие включает правую α -спираль, ω -спираль, левую α -спираль и беспорядочный клубок. Спираль 4_{13} наблюдалась Фразером и соавт. также у поли-*S*-бензилтио-*L*-цистеина; в то же время поли-*S*-бензил-*L*-цистеин имеет α -спиральную форму [149].

Поли- γ -бензил-*L*-глутамат был первым синтетическим полимером, полученным в высокоориентированной форме, которая была изучена методами рентгеновской дифракции и инфракрасных спектров в поляризованном свете [50, 97]. Полученные данные свидетельствовали в пользу α -спиральной формы полимера в твердом состоянии. Е. Брэдбери, К. Бэмфорд, А. Эллиотт, Е. Амброзе и соавт. [147, 148, 150—152], Э. Блоут, Г. Фасман и соавт. [99, 100, 153—155], П. Доти и соавт. [101] подробно исследовали вопрос о стабильности α -спирали поли- β -бензил-*L*-глутамата. Выше отмечалось, что поли- β -бензил-*L*-аспартат в растворе хлороформа и дихлоруксусной кислоты образует не правую α -спираль, а левую. Такая структура этого полимера по сравнению с правой спиралью поли- γ -бензил-*L*-глутамата менее стабильна. Разница в конформационной энергии спиралей с противоположными закрутками у поли- β -бензил-*L*-аспартата менее существенна

по сравнению с поли- γ -бензил-*L*-глутаматом. Изучение поли- γ -бензил-*L*-глутамата сыграло исключительно важную роль в утверждении α -спиральной концевости Полинга и Кори. Полимер исследовался в разных агрегатных состояниях многими авторами, использовавшими самые разнообразные методы. В результате было показано, что поли- γ -бензил-*L*-глутамат в растворе в зависимости от природы растворителя и молекулярной массы может принимать две регулярные конформации — α -спираль и β -структуру — и находиться в состоянии флуктуирующего клубка.

В. Луццати и соавт. применили новый метод рассеяния рентгеновских лучей под малыми углами для определения трансляционного параметра на остаток у полимера в растворе [156, 157]. При малоугловом рассеянии он рассчитывается из опытного значения отношения массы полимера к его длине. В концентрированном растворе поли- γ -бензил-*L*-глутамата в пиридине трансляционный параметр составил 1,5 Å, что точно отвечает α -спирали. В разбавленном же растворе Луццати и соавт. получили значение 1,9 Å и пришли к выводу, что в этих условиях полимер принимает более вытянутую, чем α -спираль, форму, а именно спираль 3_{10} . Спираль с тремя остатками на виток и с водородной связью типа $4 \rightarrow 1$, замыкающей 10-членный цикл, впервые была предложена Хаггинсом [32] и Тейлором [41].

Своеобразное пространственное строение имеют поли-*L*-пролин и полиглицин. В твердом состоянии и в растворах поли-*L*-пролин был обнаружен в двух пространственных модификациях, которые отличаются как от α -спирали, так и от β -структуры. Строение твердого поли-*L*-пролина II исследовали П. Кован и соавт. с помощью рентгеноструктурного анализа; полимеру была приписана форма левой спирали с винтовой осью третьего порядка, в которой все пептидные группы находятся в *транс*-конфигурации [158, 159]. Спираль поли-*L*-пролина II содержит три остатка на виток, высота которого составляет 3,1 Å. Позднее эти параметры были подтверждены В. Сасисекхараном [160, 161]. Структура поли-*L*-пролина II, согласно наблюдениям Е. Качальского и соавт., стабильна в водном растворе [162—164]. В растворах уксусной и муравьиной кислот полимер принимает иное строение (I). Происходящий в этих средах конформационный переход объяснен вращением вокруг связей N—C' с изменением у пептидных групп *транс*-конфигурации на *цис*-конфигурацию. Энергия активации перехода, согласно А. Даунье и А. Рэндаллу, почти такая же, как резонансная энергия амидной группы [165].

У. Трауб и Ю. Шмуэли изучили картину рентгеновской дифракции поли-*L*-пролина [166]. Авторы пришли к выводу, что эта модификация имеет форму правой спирали с 3,3 остатками на виток, шагом 1,9 Å и *цис*-конформацией пептидных групп. Таким образом, поли-*L*-пролин не образует α -спирали. Наблюдаемый факт был объяснен двумя причинами. Во-первых, остаток пролина не содержит NH-группы и поэтому не может образовывать водородной связи, которой в то время все еще придавалось исключительное значение в стабилизации α -спирали. Во-

вторых, пятичленный цикл остатка при его вхождении в α -спираль будет иметь плохие контакты с атомами предшествующих пептидных групп третьего и четвертого остатков. Поэтому пролин в α -спирали может находиться только на ее N-конце, занимая первое или второе положение. А. Сент-Дьердьи и К. Коэн обнаружили обратную зависимость между содержанием пролина и α -спиральным содержанием у фибриллярных белков α -группы k.m.e.f. [167].

Полиглицин выкристаллизовывается в зависимости от природы растворителя также в двух различных формах (I и II). Полиглицин I дает картину рентгеновской дифракции, типичную для β -структуры. Рентгенограмма полиглицина II точно не соответствует ни одной ранее обнаруженной структуре. Ф. Крик и А. Рич предположили, что полиглицин образует не одноцепочечную спираль, как все гомополипептиды, а скрученную трехцепочечную спираль [168]. Каждая нить этой структуры представляет собой правую спираль с тремя остатками на виток и шагом 3,1 Å, похожую на спираль поли-L-пролина II. Скрученные в большую спираль пептидные цепи связаны вместе пространственной сеткой из трех наборов водородных связей, расположенных перпендикулярно оси волокна. Большая спираль имеет винтовую ось третьего порядка. Структура полиглицина II в виде трехцепочечного жгута была подтверждена данными электронной микроскопии, полученными А. Мегги и Дж. Сикорским [169].

В заключение отметим наиболее важные результаты общего характера, полученные приблизительно за пятнадцатилетний период (1950—1965 гг.) экспериментального исследования пространственного строения синтетических полипептидов.

1. Разработаны методы приготовления образцов синтетических полипептидов в виде хорошо ориентированных пленок и волокон.

2. К изучению полипептидов привлечены практически все известные методы, позволяющие получать прямую или косвенную информацию о строении молекул в твердом состоянии и растворе. Наиболее интересные данные были получены с помощью рентгеноструктурного анализа, методов рассеяния рентгеновских лучей под малыми углами, дисперсии оптического вращения, кругового дихроизма и дейтерообмена обычных и поляризованных инфракрасных спектров.

3. Разработана общая теория дифракции рентгеновских лучей на спиральных структурах, позволяющая из рентгенограмм получать значения параметров, непосредственно характеризующих геометрию спирали.

4. Изучено пространственное строение гомополипептидов почти всех природных и многих синтетических α -аминокислот и их сополимеров в твердом состоянии и в растворе.

5. У синтетических полипептидов обнаружены следующие типы структур: правая и левая α -спирали, β -структура складчатых листов, спирали 4_{13} (ω), 4, 4_{18} (π) и 3_{10} , структуры поли-L-пролина I и II, полиглицина II и беспорядочный клубок.

6. Показано, что каждый из исследованных полипептидов в зависимости от внешних условий обладает способностью принимать

различные структуры и изменять положение конформационного равновесия. Структура твердого полипептида в каждом конкретном случае определяется молекулярной массой, способом приготовления образца, природой растворителя, из которого он выделяется, свободным, растянутым или сжатым состоянием образца, температурой и предварительной термической обработкой.

Конформационное состояние полипептида в растворе зависит от природы растворителя, концентрации, степени полимеризации, температуры, значений рН и ионной силы раствора. Изменение положения конформационного равновесия представляет собой своеобразное внутримолекулярное плавление, кристаллизацию и перекристаллизацию, подобно фазовому переходу первого ряда. В силу кооперативности этого процесса все промежуточные состояния между полностью упорядоченными структурами и полностью неупорядоченным статистическим клубком являются переходными структурами.

7. Обнаружено, что однородные по аминокислотному составу участки цепи в сополимерах могут принимать конформации, не наблюдающиеся у гомополипептидов.

8. Из полученного при исследовании синтетических полипептидов огромного экспериментального материала хотя и не было сделано обобщающих представлений о причинах стабильности регулярных структур, тем не менее стала очевидной необходимость привлечения новых факторов для ее объяснения. Из опытных данных следовала ограниченность концепции, согласно которой регулярные структуры поддерживаются исключительно водородными связями между пептидными группами. Такие факты, как наличие α -спирали в водной среде, реализации спиральных структур у полипептидов, основная цепь которых лишена возможности образовывать внутренние водородные связи, относительная легкость перехода спираль-клубок и разрушение спиралей при изменении состояния боковых цепей и т.д., свидетельствовали о том, что пептидная водородная связь по меньшей мере не является единственной причиной, ответственной за стабильность регулярных структур.

В результате начинает постепенно формироваться представление, что конформационная стабильность пептидов определяется совокупностью многих факторов. Среди них выделяют взаимодействия пептидных групп между собой, боковых цепей друг с другом и с пептидным остовом, с молекулами растворителя, которые могут иметь различную природу. В чисто качественном плане и пока несистематически обсуждаются роли ван-дер-ваальсовых контактов и дисперсионного притяжения, ионных пар и их электростатических эффектов, водородных связей между основной и боковыми цепями; большое значение начинают придавать гидрофобным связям. Несмотря на это, доминирующей все еще остается концепция об исключительной роли пептидных водородных связей в устойчивости регулярных структур.

9. Результаты исследования синтетических полипептидов и полученные к этому времени данные о структурах фибриллярных и глобулярных белков не противоречили общепринятому мнению о том,

что пространственное строение представляет собой ансамбль, состоящий из унифицированных регулярных блоков вторичных структур, прямую информацию о геометрии которых могут дать высокомолекулярные полипептиды. Такое представление не только не было поставлено под сомнение, но еще более укрепились. В 1967 г. Фасман писал: "Общепризнанно, что лишь несколько конформаций благодаря своей внутренней термодинамической стабильности будут встречаться наиболее часто и, по-видимому, именно они составляют общую основу белковой структуры" [112. С. 598].

В то же время обнаруженные у гомополипептидов всех природных α -аминокислот многообразие форм и многочисленность влияющих на структуру факторов, а также отсутствие даже в случае простейших полипептидов должного понимания причин реализации у них различных конформаций указывали на то, что вопрос об общности структур искусственных и природных полипептидов не является столь простым, как это представлялось ранее. Предложенная Блоутом конформационная гипотеза разделения аминокислот на спиралеобразующие и спираленеобразующие опиралась на ограниченный экспериментальный материал. Она не согласовывалась со многими, известными в то время фактами. Популярность этой гипотезы можно объяснить лишь отсутствием альтернатив. Структурные исследования синтетических полипептидов не оправдали первоначальной надежды найти простые корреляции между химическим и пространственным строением полипептидов. Полученные экспериментальные данные показали, что таких простых корреляций не существует даже в рамках гомополипептидов.

Глава 2

СТАНОВЛЕНИЕ МЕТОДА РЕНТГЕНОСТРУКТУРНОГО АНАЛИЗА ГЛОБУЛЯРНЫХ БЕЛКОВ

Изучение пространственного строения глобулярных белков в период, непосредственно следующий за открытием Полингом и Кори α -спиралей и β -структуры (1950-е годы), может показаться на первый взгляд менее впечатляющим по сравнению со структурными исследованиями того же периода синтетических полипептидов. Однако если в то время исследователи полипептидов уже сказали все или почти все, что они могли сказать полезного о пространственной организации белковых молекул, то у ученых, занимавшихся кристаллографией глобулярных белков, решавших в 1950-е годы свои внутренние проблемы, все еще было впереди. Для того чтобы прийти к результатам, которые потом составят целую эпоху в развитии молекулярной биологии и кристаллографии макромолекул, необходимо было преодолеть целый комплекс методических трудностей. Сейчас очевидно, какая колос-

сальная потенция была заключена в рентгеноструктурном анализе белков и как позднее были блестяще реализованы его возможности при решении многих проблем молекулярной биологии. Тогда же об этом не догадывались не только ученые, стоящие в стороне от данного метода, но и его энтузиасты и даже непосредственные исполнители. Так, один из создателей рентгеноструктурного анализа, основатель крупнейшей школы кристаллографов, где начали изучаться белки, Л. Брэгг, всегда горячо поддерживавший М. Перутца и Дж. Кендрию, оценивал эту работу в 1947 г., как обладающую "вероятностью успеха, не отличающейся существенно от нуля" [170].

Не представляли всей сложности выбранного ими пути Перутц и Кендрию, первые определившие структуру белков на атомно-молекулярном уровне. М. Перутц в 1970 г. подчеркивал, что он поначалу и не думал о решении проблемы полной структуры, а Дж. Кендрию полусутья утверждал, что для него первоначальное невежество в области методики оказалось благом, поскольку оно не позволило ему осознать все трудности. Столь же откровенные и, безусловно, правдивые слова, по-видимому, могли бы сказать многие ученые, добившиеся выдающихся результатов. Часто одна из граней таланта исследователя проявляется не столько в четком представлении всей сложности изучаемого им явления и строгой оценке возникающих при этом трудностей, сколько в своевременности постановки проблемы, умении распределить трудности в определенном порядке и преодолении их не одновременно, а последовательно, зная, конечно, с чего нужно начать.

2.1. ОСОБЕННОСТИ РЕНТГЕНОСТРУКТУРНОГО АНАЛИЗА ГЛОБУЛЯРНЫХ БЕЛКОВ

Систематическая работа с белками началась в конце 1920-х годов У. Астбери, который был привлечен для решения проблемы пространственного строения шерстяных волокон У. Брэггом. Позднее в содружестве со специалистами по химии шерсти он изучал с помощью рентгеноструктурного анализа фибриллярные белки, начав с кератина (см. гл. 1). Другой выдающийся ученик школы У. Брэгга, Дж. Бернал, начал в 1934 г. изучение кристаллических глобулярных белков. Он работал с И. Фанкухеном и Д. Кроуфут (Ходжкин). Вскоре к ним присоединились М. Перутц, бывший студент Л. Брэгга, избравший в 1937 г. предметом своей диссертации определение кристаллической структуры гемоглобина, Д. Райли и Дж. Бойес-Уотсон. С 1946 г. сначала вместе с М. Перутцем, а потом самостоятельно в этой области начал работать Дж. Кендрию, также ученик Л. Брэгга, а с 1955 г. — Д. Филлипс. Если сюда же присоединить Ф. Крика, ставшего заниматься белками в 1949 г., то получим почти полный список лиц, создавших кристаллографию белка и выполнивших пионерские исследования по расшифровке трехмерных структур белковых молекул. Путь к этому прошел через решение следующих проблем: 1) получение белковых кристаллов; 2) решение проблем фаз; 3) получение изоморфных

тяжелоатомных производных; 4) измерение интенсивностей большого числа отражений; 5) разработка алгоритма и создание компьютерных программ; 6) построение карт электронной плотности и интерпретация результатов.

Каждая из проблем включала как чисто научные, так и многочисленные методологические и технические вопросы. Все здесь решалось впервые не только из-за уникальности объекта и его чрезвычайной сложности, но также и потому, что метод рентгеноструктурного анализа не был еще достаточно разработан. Первая трудность, с которой пришлось столкнуться, заключалась в получении белковых кристаллов нужных размеров и хорошего качества. До работы Бернала и Кроуфут с пепсином не было получено удовлетворительных дифракционных картин ни для одного глобулярного белка [42]. Дело в том, что кристаллы белков необычны в том отношении, что они содержат приблизительно 50% воды (по объему). При длительной экспозиции образец высыхал и кристалличность белка терялась. Авторы разработали метод получения увлажненных кристаллов. Во избежание гидратации образец в маточном растворе помещался в капилляр. В первой же работе был получен результат принципиальной важности. Дж. Бернал и Д. Кроуфут наблюдали четкую дифракционную картину кристаллического пепсина, которая пока еще неясным образом заключала в себе структурные детали белка вплоть до атомного уровня. Наличие на рентгенограмме огромного числа рефлексов могло иметь место только при идентичности пространственной организации всех молекул пепсина, по крайней мере в кристаллическом состоянии белка. Кроме того, удалось установить, что белковые молекулы представляют собой плотноупакованные тела глобулярной формы диаметром 25–35 Å.

Другая проблема, также связанная с подготовкой кристаллов к съемке, возникла значительно позже, когда в принципе была решена фазовая проблема и встала задача получения кристаллов изоморфных производных. На первых же порах, после получения прекрасных дифракционных снимков глобулярных белков, требовалось решить вопрос об их расшифровке. В чем же заключалась новизна рентгеноструктурного анализа глобулярных белков по сравнению с анализом малых молекул и фибриллярных белков? Суть рентгеноструктурного анализа любого монокристалла состоит в определении амплитуд всех дифрагированных лучей (отражений) и их фаз. Зная амплитуды и фазы, можно воспроизвести распределение электронной плотности элементарной кристаллической ячейки и, следовательно, найти ее геометрические параметры, а также параметры структуры образующих ее молекул. Амплитуды определяются по интенсивностям рефлексов, но найти фазы путем непосредственных измерений нельзя. В связи с этим как в кристаллографии малых молекул, так и в кристаллографии белков возникает так называемая фазовая проблема – основная проблема расшифровки любой кристаллографической структуры. В рентгеноструктурном анализе малых молекул для ее решения разработаны прямой метод, метод Паттерсона, метод проб и ошибок, метод изоморфного замещения. Со временем каждый из них приобрел целый ряд

вариантов [171]. В дифракционной картине, даваемой единичной молекулой (молекулярной трансформанте), расположение пиков и впадин чередуется. Оказалось возможным составить уравнения, связывающие фазы и амплитуды различных структурных факторов. Эти уравнения, когда их не очень много, поддаются аналитическому решению без привлечения интуитивных соображений и субъективных оценок. В результате становятся известными фазы. Такой подход получил название прямого метода.

В середине 1930-х годов А. Паттерсон разработал метод, который позволяет частично обходить проблему фаз, причем это делалось тем надежнее, чем проще молекула [172]. Метод основан на получении функции распределения (функции Паттерсона), представляющей собой ряды Фурье, в которых коэффициентами или структурными амплитудами $\vec{F}_{hkl}$ служат получаемые опытным путем значения интенсивности отраженных пучков лучей. Поскольку функция Паттерсона является фурье-трансформантой величины F_{hkl}^2 , а не $\vec{F}_{hkl}$, ее можно рассчитать непосредственно по наблюдаемой дифракционной картине. На этой основе строятся векторные карты, дающие ориентировочное представление о структуре молекулы. Трудность в интерпретации функции Паттерсона состоит в необходимости нахождения координат n атомов из n^2 ее максимумов, многие из которых сливаются из-за частотного пересечения межатомных векторов. В результате метод Паттерсона оказался применимым только для монокристаллов простых молекул. Его несостоятельность для расшифровки белковых рентгенограмм была в принципе ясна уже в конце 1930-х годов. Позднее это подтвердила Кроуфут, построившая плоские и пространственные карты Паттерсона для инсулина, и Перутц, рассчитавший их для гемоглобина. Паттерсоновские карты белков содержали многие сотни тысяч межатомных векторов, интерпретировать которые и разрешить с их помощью отдельные пики не представлялось возможным.

В основе метода проб и ошибок лежат постулированные модели, соответствие которых реальной структуре оценивается с помощью фактора расходимости (R), определяемого экспериментальными (F_3) и теоретическими (F_T) значениями структурных факторов

$$\left(R = \sum_{hkl} \left([F_3] - [F_T] / \sum_{hkl} [F_3] \right) \right).$$

Метод также применим лишь к малым молекулам, поскольку вероятность угадать структуру сложной молекулы, тем более белка, ничтожно мала.

Метод изоморфного замещения уже в течение тридцати лет является основным, если не единственным, в рентгеноструктурном анализе белков. Его монополия была нарушена лишь в начале 1990-х годов (см. гл. 4). Метод предложен в 1937 г. Дж. Робертсоном и И. Вудвордом при расшифровке структуры фталоцианинов [173]. Он быстро превратился в общий метод анализа структур малых молекул, поскольку основывался на разумном предположении о том, что при

химическом замещении одного атома в молекуле на другой, сходный по электронному строению, например атома серы на селен, брома на йод, пространственная структура молекулы не претерпевает существенных изменений. Изоморфное производное считается совершенным, если ряд электронной плотности замещенной молекулы отличается от ряда исходной молекулы только наличием пика в положении замещения тяжелым атомом. Естественно, долгое время, пока ни для одного из белков не было известно химическое строение, мысль об использовании этого метода в кристаллографии белков никому не приходила. Таким образом, все существовавшие методы решения фазовой проблемы были созданы для малых молекул и прямо не подходили для белков. Даже сейчас возможности этих методов ограничены элементарными ячейками, содержащими не более ста атомов.

Не могли быть использованы для глобулярных белков методы рентгеноструктурного анализа фибриллярных белков. Рентгенограммы последних вследствие неполной упорядоченности и нестрогой регулярности волокон содержат небольшое число рефлексов (5–50), которые к тому же, как правило, диффузны. Они получаются за счет дифракции рентгеновских лучей на регулярных участках волокон. На основе столь бедной рентгенограммы нельзя даже в принципе выполнить полное и независимое определение на атомном уровне структуры фибриллярного белка. Иными словами, число неизвестных (координаты атомов) в этой задаче намного превышает число уравнений, которые могут быть составлены для их определения на основе известных экспериментальных данных (положений и интенсивностей рефлексов). Волокнистая структура и нерастворимость таких белков делают практически невозможной их кристаллизацию с хорошей трехмерной упорядоченностью. Поэтому с помощью анализа рентгенограмм фибриллярных белков можно преследовать лишь ограниченную цель идентификации типа регулярных структур пептидного скелета и возможного способа его аранжировки. Сначала создается ориентировочная модель, причем только регулярной части белка, рассчитывается картина рентгеновской дифракции этой модели, которая затем сопоставляется с наблюдаемой рентгенограммой. Путем изменения модели добиваются наиболее полного совпадения теоретической и экспериментальной дифракционных картин. Но и такая задача далеко не всегда решается однозначно. Поэтому при рентгеноструктурном анализе фибриллярных белков большое значение имеют дополнительные данные о структуре, полученные иным образом, с помощью привлечения спектральных методов, структурных параметров родственных молекул, информации о плотности, механических свойствах и т.д. Расчет дифракционной картины, соответствующей предполагаемому спиральному строению фибриллярного белка, выполняется на основе теории интерференции рентгеновских лучей спиральными структурами, разработанной Кокраном и Криком [77]. Обзор методов рентгеноструктурного исследования фибриллярных белков содержится в работе К. Холмса и Д. Блоу [174].

Глобулярные белки в отличие от фибриллярных могут образовывать великолепные монокристаллы, в которых все молекулы идентич-

ны и одинаково ориентированы. Об этом свидетельствовали первые же результаты рентгеновского исследования пепсина, инсулина и гемоглобина [175–178]. Дифракционные картины от кристаллов перечисленных белков содержат огромное число рефлексов. Например, рентгенограмма монокристалла миоглобина, изучение которого было начато в 1948 г. Кендрью, насчитывает около 50 000 рефлексов, т.е. несколько десятков рефлексов на один рассеивающий центр – атом [179]. Таким образом, в случае кристаллических глобулярных белков в отличие от волокнистых фибриллярных белков число неизвестных геометрических параметров молекулы значительно уступает числу уравнений, которые могут быть составлены. Следовательно, рентгеноструктурный анализ глобулярных белков в принципе является таким методом исследования пространственного строения, который может быть выполнен на атомном уровне, не требуя какой-либо дополнительной информации. Чтобы получить из рентгенограммы монокристалла трехмерное изображение молекулярной структуры глобулярного белка, необходимо было прежде всего найти путь к решению фазовой проблемы.

Дж. Бернал в конце 1930-х годов предложил два подхода к решению проблемы фаз в рентгеноструктурном анализе белков [180]. Оба они включали функцию Паттерсона и основывались на изменении интенсивностей отраженных рентгеновских лучей, которое обнаруживалось даже при небольших модификациях кристаллов. Первый из них, так называемый метод набухания и усадки, пытался в течение ряда лет использовать Перутц для определения фаз в дифракционной картине гемоглобина [181–187]. Заметного успеха в решении проблемы добиться не удалось. Тем не менее в этих работах Перутца были получены интересные данные, касающиеся внутреннего устройства гемоглобина. В частности, результатом наблюдения изменения интенсивностей дифракционных рефлексов, происходящего из-за диффузии солей в жидкость при кристаллизации белка, явилось правильное определение внешнего очертания полипептидной цепи макромолекулы. Полученное представление подтверждено изучением дифракционных картин кристаллических форм с разной упаковкой молекул. У. Брэггом и М. Перутцем обнаружено соответствие между рентгеновской дифракцией α -кератина и паттерсоновским синтезом гемоглобина [188, 189]. Пространственная векторная карта свидетельствовала о присутствии в структуре стержней протяженностью не менее 10,0 Å, разделенных между собой фрагментами в ~ 5,0 Å. Был сделан вывод о том, что форма этих стержней соответствует структуре полипептидной цепи α -кератина. Подобные стержни вскоре были найдены Кендрью в миоглобине [190, 191]. После открытия Полингом радиальной усредненной векторной плотности паттерсоновского синтеза было высказано предположение, что гемоглобин представляет собой ансамбль α -спиралей.

Ю. Арндт и Д. Райли измерили интенсивность рентгеновского рассеяния под разными углами у большой серии аморфных белковых образцов, включая гемоглобин и миоглобин, и пришли к выводу, что спираль является важнейшим структурным компонентом большинства

из них [192]. То, что α -спираль составляет главную часть глобулярных белков, подтверждалось многими другими данными. Так, в дифракционной картине тропомиозина обнаружен интенсивный рефлекс $1,5 \text{ \AA}$ — характерная особенность рассеяния α -спирали. Согласно спектрам дисперсии оптического вращения, исследованным Коэном и Сент-Дьердьи, термолизин содержит 70–80% α -спиралей [193]. Исключение, пожалуй, составляла одна рибонуклеаза, которая по данным рентгеноструктурного анализа и дисперсии оптического вращения практически не содержала этой структуры, а также других регулярно свернутых форм.

Вопрос о структурной организации молекул глобулярных белков был одним из наиболее дискутируемых в 1950-е годы. Подавляющее большинство исследователей было единодушно в своем положительном отношении к α -спиральной концепции Полинга и Кори. Выше отмечалось, что в это время для инсулина одновременно несколькими авторами были предложены совершенно различные, но практически полностью α -спиральные структуры. Даже для рибонуклеазы считалось, что регулярное свертывание боковой цепи в нативной конформации нарушается лишь в местах включения в аминокислотную последовательность остатков пролина (предполагалось, что только из-за невозможности образования водородной связи $5 \rightarrow 1$) и цистеина.

Вторым методом, предложенным Берналом для решения фазовой проблемы рентгеноструктурного анализа белков, был метод изоморфного замещения [180]. В той форме, в какой он применялся кристаллографами-органиками, его нельзя было использовать для белков из-за трудности получения гомогеннозамещенных молекул. Дж. Бернал исходил не из валентного связывания тяжелого атома с молекулой, как это делали Дж. Робертсон и И. Вудворд [173], а из специфического невалентного взаимодействия тяжелого атома с белком, определяемого характером профиля его потенциальной поверхности. Строго говоря, речь шла не о замещении тяжелым атомом, а о его присоединении. Оказалось возможным связать тяжелый атом с поверхностью белка без нарушения его молекулярной кристаллической структуры. Это удалось сделать Брэггу и Перутцу, которые получили изоморфные производные кристаллов нативного гемоглобина путем диффузии тяжелых атомов [194].

Тяжелые атомы (Hg, Pt, Au, U и др.), присоединенные к молекуле белка, не только создают на рентгенограмме новые рефлексy, но, обладая значительной электронной плотностью и большой рассеивающей способностью, изменяют интенсивность белковых рефлексов. Изменение интенсивности зависит от взаимного расположения тех или иных фрагментов белка и тяжелых атомов. Различие в интенсивностях отраженных лучей в дифракционных картинах нативного белка и его производных делает возможным, если известны положения тяжелых атомов, определение фазовых значений рефлексов. Применение производных белка, содержащих несколько тяжелых атомов, позволяет решить проблему фаз однозначно. Необходимым условием является полное сохранение структуры белкового кристалла при введении тяжелых атомов.

Метод изоморфного замещения был использован Брэггом и Перутцем для расчета знаков рефлексов в дифракционной картине гемоглобина. Описание деталей этого исследования содержится в работе Д. Грина, В. Ингрэма и М. Перутца [195].

После создания метода, позволившего решить в кристаллографии белков проблему фаз и преодолеть трудности получения нужных кристаллов нативного белка и его изоморфных производных, встала задача измерения интенсивностей отражений в дифракционной картине. Она также не имела аналогий, поскольку касалась измерений, несопоставимых с кристаллографией малых молекул по числу дифрагированных лучей, многие из которых малоинтенсивны. Ощутимый прогресс в решении этой задачи наступил только в конце 1960-х годов, после создания полностью автоматизированных дифрактометров. В последующие годы сцинтилляционные счетчики, способные регистрировать отдельные кванты рентгеновского излучения, были соединены с прибором, автоматически перемещающим кристалл и детектор с одного дифрагированного луча к другому, что привело к достаточно эффективной и точной регистрации интенсивности. В последнее время усовершенствование эксперимента направлено на создание источников рентгеновского излучения повышенной яркости и монохроматичности. Однако при этом возрастает опасность радиационного разрушения образца, вполне реальная в кристаллографии белков.

Обработка данных, полученных при измерении интенсивностей огромных массивов отражений, была бы просто немыслима без использования электронной вычислительной техники. Кроме того, в ходе вычислений необходимо введение поправок на фон, на фактор Лорентца, учитывающий относительное время нахождения каждой узловой плоскости в отражающем положении, на фактор частичной поляризации дифрагированного луча, если подающий луч не поляризован, на поглощение, радиационное разрушение кристалла и т.д. Необходим также контроль за вычислением и устранением ошибок случайного характера. Работа по расшифровке трехмерных структур белков, начатая до появления вычислительной техники, не была бы доведена до конца, если бы такая техника не была создана во второй половине 1950-х годов. Увеличение темпа рентгеноструктурных исследований в последнее время во многом обусловлено развитием вычислительной техники, возможностью использования быстродействующих ЭВМ с большим объемом памяти и совершенными программами.

Изображение, полученное после математической обработки измерений дифракционной картины, отражает распределение электронов в кристалле. Обычно вычисляют электронную плотность в каком-то регулярном множестве точек и соединяют точки одинаковой электронной плотности линиями, получая таким образом плоские контурные карты. Расположенные в определенном порядке карты, вычерченные на прозрачных пластинках, передают распределение электронной плотности в трехмерном пространстве. Количество деталей структуры, видимых на таком изображении, зависит от количества рефлексов, использованных для построения контурных карт. При включении в

анализ почернений, вызванных рассеянием рентгеновских лучей под большими углами, можно видеть атомы, которые на картах электронной плотности выступают в виде отдельных пиков. При меньшем разрешении видны только группы атомов, имеющие характерное распределение электронной плотности, по которому их можно распознать. Интерпретацию карт, как правило, проводят с помощью механических атомных моделей. Точность их изготовления достаточна для воспроизведения стандартных длин связей и валентных углов, найденных в рентгеноструктурных исследованиях отдельных аминокислот и простейших пептидов. Узнавание аминокислотных остатков в белке почти всегда основывается на данных о последовательности аминокислот, определенной с помощью химико-ферментативных методов или приемов геной инженерии. Для углубленного ознакомления с теорией и современной методологией кристаллографии белка могут быть рекомендованы книги Т. Бландела и Л. Джонсона [196] и Д. Макри [197].

2.2. ТРЕХМЕРНЫЕ СТРУКТУРЫ МИОГЛОБИНА И ГЕМОГЛОБИНА

Выше отмечалось, что развитие рентгеноструктурного анализа белков получило необходимый импульс в 1954 г., после того как Брэгг и Перутц впервые использовали метод изоморфного замещения для расчета знаков рефлексов в рентгенограммах гемоглобина [194]. Однако не гемоглобин оказался первым белком, трехмерная структура которого стала известной. Вследствие меньшего размера, а также благодаря более счастливому случаю с нахождением изоморфных производных и их кристаллизацией таким белком стал миоглобин. Молекула миоглобина состоит из 153 аминокислотных остатков (около 2500 атомов), образующих одну полипептидную цепь. К свернутой цепи прикреплена порфириновая плоская группа гема с атомом двухвалентного железа в центре, к которому и присоединяется молекула кислорода. Рентгеноструктурное изучение молекулы миоглобина, начатое Кендрию в 1948 г., проводилось в два этапа [198, 199]. Вначале в расчет было принято небольшое число рефлексов – несколько сотен. Этого оказалось достаточно для того, чтобы построить модель молекулы с низким разрешением. Такая модель с разрешением 6,0 Å была получена в 1958 г. Кендрию и соавт. [200, 201]. На ней нельзя было обнаружить не только отдельные атомы, но и боковые цепи аминокислотных остатков; модель отражала конфигурацию полипептидной цепи и местоположение группы гема, содержащей атом железа. Это был первый случай, когда удалось получить, по существу, фотографию молекулы белка, правда, недостаточно четкую.

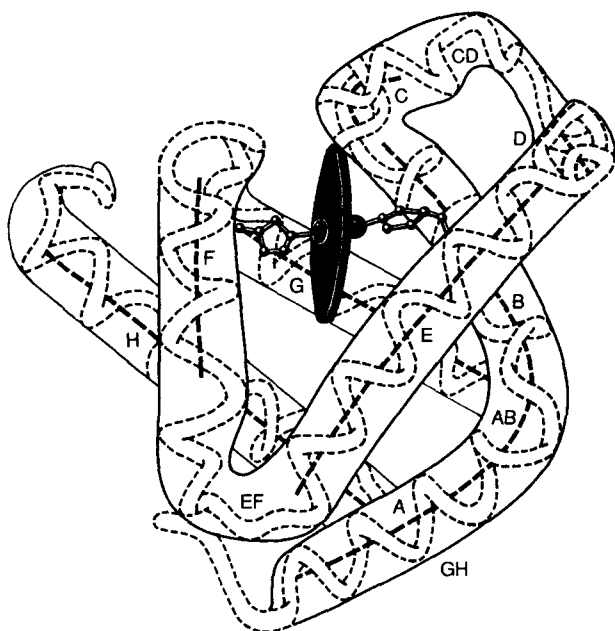
Как отмечалось выше, при создании всех гипотетических моделей белка предполагалась симметричная укладка основной цепи. У. Брэгг по этому поводу писал: "Долгое время путеводной звездой, вдохновляющей исследования, оставалась та идея, что молекулы содержат некий род упорядоченной структуры белковых цепей, которая может

быть ответственна за строго определенный характер синтеза Паттерсона. Как показали события, звезда эта оказалась ложной" [202, С. 5]. Поэтому наиболее удивительной особенностью построенной Кендрю модели явилось как раз полное отсутствие видимой регулярности и симметрии молекулы миоглобина.

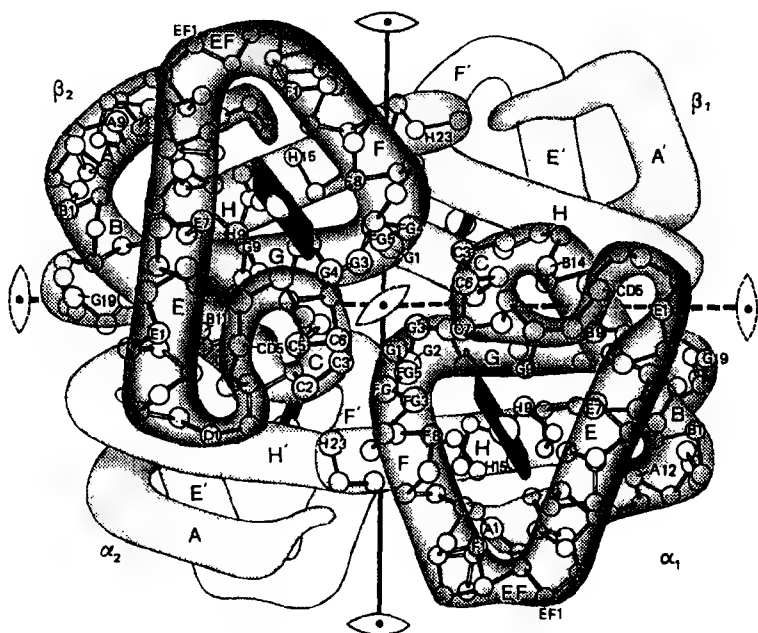
Для получения трехмерной структуры миоглобина с разрешением, которое давало бы возможность увидеть положение каждого отдельного атома, потребовался анализ более 10 000 рефлексов. Такая работа Кендрю и соавт. была закончена в 1960 г., результатом явилась модель белка с разрешением 2,0 Å (рис. 1.1) [203–205]. Найденное на основе строгого рентгеноструктурного анализа пространственное строение белка подтвердило предположение Брэгга, Кендрю и Перутца о наличии в структуре миоглобина локальных спиральных образований цилиндрической формы и предположение Полинга и Кори о том, что эти образования являются α -спиралями. Оказалось, что около 75% аминокислотных остатков составляют восемь правых α -спиралей А, В, ..., Н. Остальные остатки входят в неупорядоченные участки. Обрыв α -спиралей в миоглобине происходит, как правило, вблизи остатков пролина, серина и треонина, которые, согласно конформационной гипотезе Блоута, относятся к спираленеобразующим.

Структура гемоглобина с низким разрешением (5,5 Å) была получена Перутцем и соавт. в 1960, а с высоким разрешением (2,2 Å) – в 1968 г. (рис. 1.2) [206–208]. Таким образом, был закончен труд, продолжавшийся около 30 лет. Напомним, что эта работа была начата Перутцем в то время, когда расшифровка структуры обычной органической молекулы из 10–15 атомов была трудноосуществимой задачей, а сама постановка исследования пространственного строения биологической молекулы, состоящей из многих тысяч атомов, представлялась фантастической даже специалистам. Молекула гемоглобина построена из 574 аминокислотных остатков и содержит около 10 000 атомов. Она имеет четвертичную структуру и состоит из четырех глобул: двух α - и двух β -субъединиц, содержащих соответственно 141 и 146 аминокислотных остатков. Между α - и β -субъединицами существует значительная гомология; близки также их конформации. Молекула гемоглобина имеет сферическую форму с диаметром ~ 55 Å. Оказалось, что α - и β -цепи гемоглобина похожи на цепь миоглобина. Это был интересный и многозначительный факт. Гемоглобин был взят у лошади, а миоглобин – у кашалота. Таким образом, структуры двух белков из разных типов клеток и разных животных, но обладающих сходной функцией, имели близкое пространственное строение.

Анализ третичных структур миоглобина и гемоглобина позволил сделать ряд наблюдений, имеющих, как тогда казалось, общее значение. Расположение неполярных и полярных аминокислотных остатков в α -спиралях и взаимная ориентация спиралей в глобуле таковы, что неполярные остатки, в согласии с концепцией У. Козмана, оказываются в значительной мере экранированными от контактов с водой, а полярные, напротив, взаимодействуют с молекулами воды [209, 210].



Р и с. 1.1. Модель трехмерной структуры миоглобина



Р и с. 1.2. Модель трехмерной структуры гемоглобина

Плотноупакованные остатки с неполярными боковыми цепями находятся во внутренних частях глобул миоглобина и α - и β -субъединиц гемоглобина. Их число составляет приблизительно половину общего количества неполярных остатков. Многие остатки глицина и аланина располагаются на поверхности глобулы. Остатки с объемными гидрофобными боковыми цепями, не попадающие во внутреннюю часть, спрятаны от контактов с водой в щелях, образованных цепями вблизи поверхности. Все это находилось в полном соответствии с развитым Козманом представлением о гидрофобных взаимодействиях.

Подавляющее большинство полярных остатков (в миоглобине, например, исключение составляют лишь 5 остатков из 77) находится на поверхности. Напрашивается вывод, что полярные и неполярные остатки располагаются в аминокислотной последовательности таким образом, что, с одной стороны, они осуществляют взаимодействия, стабилизирующие отдельные спиральные формы, насыщенные водородными связями, а с другой – обеспечивают термодинамически выгодные контакты между спиралями и взаимодействия спиралей с внешней средой. Иными словами, в глобуле имеет место взаимная стабилизация вторичных и третичных структур. Ионные пары в белках находятся в водном окружении, так как при их образовании освобождаются ориентированные молекулы воды, окружающие заряженные группы. При образовании ионных пар, как установил Козман, энтропия воды возрастает и понижение за этот счет свободной энергии более значительно, чем выигрыш энергии при чисто кулоновском взаимодействии молекул воды с изолированными полярными группами [210].

Изучение М. Перутцем, Дж. Кендрью и Г. Уотсоном гемоглобинов различных видов позвоночных (приматов, лошади, свиньи и др.) и миоглобинов кашалота и человека показало, что в подавляющем большинстве случаев наблюдаются эквивалентные в отношении природы боковых цепей замены остатков [211]. Рассмотрев характер замещений в аминокислотных последовательностях при филогенезе, авторы отметили неодинаковую структурную роль остатков. За правильное свертывание белковой цепи в нативную конформацию ответственны остатки, оказывающиеся при свертывании цепи внутри глобулы, а не экспонированные к растворителю.

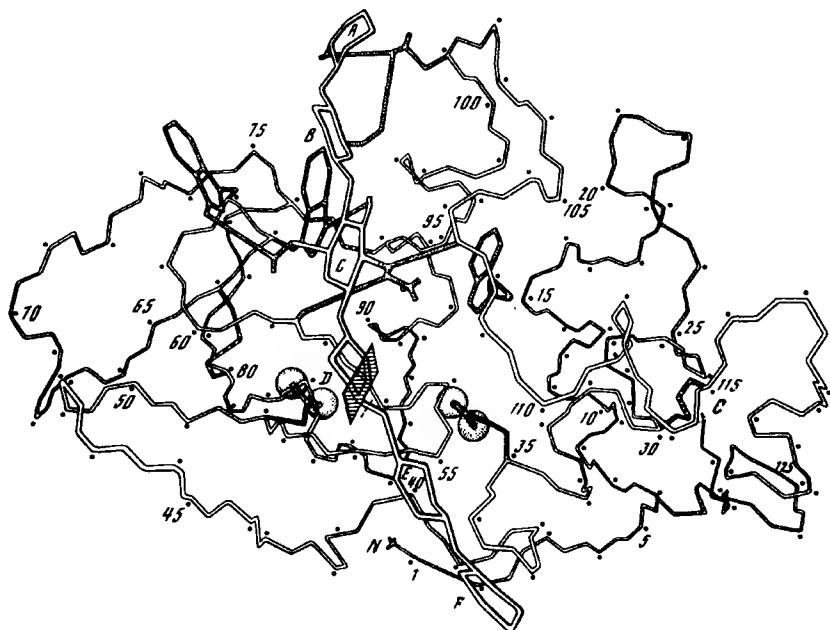
Работы Перутца и Кендрью, благодаря которым впервые стали известны на атомном уровне трехмерные структуры двух глобулярных белков, дали блестящее и как будто бы бесспорное доказательство справедливости предположения, высказанного еще Астбери и господствующего в молекулярной биологии в течение десятилетий, о единстве структурных элементов глобулярных и фибриллярных белков и синтетических полипептидов. Третичные структуры миоглобина и гемоглобина явились подлинным триумфом α -спиральной концепции Полинга–Кори. В сложных, лишенных внешней симметрии молекулярных конформациях этих белков α -спираль действительно оказалась доминирующей структурой. После расшифровки строения миоглобина и гемоглобина для многих исследователей концепция Полинга–Кори пред-

стала уже не как весьма правдоподобная и полезная рабочая гипотеза, а как не вызывающий никаких сомнений принцип пространственной организации белковых молекул. Эта концепция послужила основополагающей идеей поиска эмпирических правил свертывания полипептидной цепи с известной последовательностью.

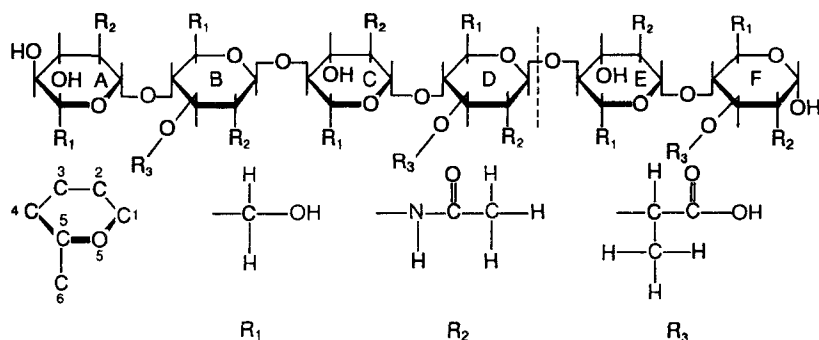
2.3. ТРЕХМЕРНАЯ СТРУКТУРА ЛИЗОЦИМА

Первым ферментом, у которого была выяснена третичная структура и каталитические свойства которого были рассмотрены на основе знания расположения атомов в активном центре, был лизоцим. Его химическое строение установлено П. Жолле в 1962 г., а несколько позднее Р. Кенфилдом. Фермент, выделенный из яичного белка, представляет собой одну полипептидную цепь из 129 аминокислот. Расшифровка структуры белка была начата Филлипсом и соавт. в 1960 г.; через два года было получено изображение с малым разрешением 6,0 Å [212–214]. В 1965 г. выполнен расчет структуры при учете около 10 000 рефлексов с разрешением в 2,0 Å [215–218]. Трехмерная структура лизоцима имеет форму эллипсоида с осями $\sim 45 \times 30 \times 30$ Å. Она содержит лишь несколько коротких, сильноискаженных и с трудом узнаваемых спиральных участков (рис. 1.3). Пептидные группы в них, как правило, повернуты таким образом, что связи $C=O$ направлены наружу по отношению к оси спирали, а $N-H$ – внутрь. В результате такого поворота связи $N-H$ попадают в промежутки между карбоксильными группами третьего и четвертого остатков и, следовательно, не образуют оптимальных водородных связей. В ряде мест пептидная цепь скручена таким образом, что получается структура, промежуточная между α -спиралью и спиралью 3_{10} . В молекуле лизоцима имеется короткий участок антипараллельной β -структуры. Более половины всех аминокислотных остатков входят в полностью нерегулярные структуры.

Таким образом, лизоцим в отношении вторичных структур существенно отличается от миоглобина и гемоглобина; его спиральные участки содержат не три четверти остатков, как в случае миоглобина, а менее четверти, причем и они, как отмечалось, имеют нерегулярную форму. Поэтому здесь уже нельзя сказать, что третичная структура белка практически полностью определяется способом укладки регулярных вторичных структур. Некоторые особенности строения лизоцима, однако, согласуются с теми, которые были отмечены у ранее исследованных белков. Остатки с полярными боковыми цепями находятся, как правило, на поверхности глобулы и взаимодействуют с молекулами воды. Некоторые остатки защищены от контактов с окружающей средой и взаимодействуют между собой, образуя гидрофобные кластеры. Условия, в которых находятся молекулы в кристаллическом белке, в сущности незначительно отличаются от естественных условий в клетке. Кристаллы включают около 35% по массе (50% по объему) жидкости, главным образом воду. Поэтому, как отмечает Филлипс,



Р и с. I.3. Трехмерная структура фермент-ингибиторного комплекса лизоцима



Р и с. I.4. Фрагмент полисахарида, содержащегося в оболочках бактериальных клеток, — субстрат лизоцима

A, C, E — остатки N-ацетилглюкозамина (N-АГ); B, D, F — остатки N-ацетилмурамовой кислоты (N-АМ). Фермент расщепляет связь между кольцами D и E

конформационное состояние белка в кристалле должно быть близким к состоянию в растворе [217].

Д. Филлипс и соавт. также впервые получили в 1967 г. структуру фермент-ингибиторного комплекса с хорошим разрешением [219–221]. Так как ферментативный каталитический акт является быстрым процессом, то исследовать непосредственно структуру фермент-субст-

ратных комплексов с помощью рентгеновской дифракции не представляется возможным. Д. Филлипс получил кристаллы устойчивого невалентного фермент-ингибиторного комплекса лизоцима с три-N-ацетил-глюкозаминном (GlcNAc). Молекулы соединения легко диффундируют внутрь белкового кристалла по пронизывающим его каналам, заполненным водой, и располагаются в активных центрах молекул фермента. Отправным моментом исследования были данные В. Венцеля, обнаружившего, что фермент становится неактивным в присутствии GlcNAc. Эта молекула является частью гексасахарида, который в обычных условиях расщепляется ферментом. Естественно было предположить, что GlcNAc, действуя как конкурентный ингибитор, присоединяется к ферменту таким же образом, как соответствующая часть молекулы субстрата. Полученные результаты оказались весьма интересными. Во-первых, было выяснено место посадки трисахарида. Молекула GlcNAc заполняет верхнюю половину щели активного центра, связываясь с ферментом за счет слабых невалентных взаимодействий и водородных связей. Во-вторых, было показано, что образование невалентного комплекса сопряжено с конформационными изменениями фермента. Из дифференциальной картины, фиксирующей различия в распределении электронной плотности нативного фермента и его комплекса, отчетливо были видны смещения боковых цепей некоторых остатков и сужение щели при связывании GlcNAc. Необходимость изменения конформаций ферментов в процессе каталитического акта неоднократно обсуждалась в литературе и до этого. Однако впервые удалось наблюдать изменения структуры белка экспериментально и оценить их количественно. Молекула GlcNAc занимает только половину активного центра фермента. Поэтому для получения представления о структуре фермент-субстратного комплекса была построена модель, в которой к GlcNAc были добавлены еще три сахарных остатка (рис. I.3). При построении модели Филлипс и сотрудники считали, что атомы четвертого сахарного кольца (D) будут образовывать слишком близкие, неблагоприятные контакты в том случае, если при этом не будет деформирована наиболее стабильная конформация кольца D (кресло) до напряженной конформации полукресла. В остальных участках возможность образования удовлетворительных взаимодействий была очевидной и модельный субстрат вписывался в структуру щели без изменения (рис. I. 4).

Предположение о деформации кольца D при посадке субстрата в активный центр согласовывалось с предложенным К. Верноном в 1967 г. химическим механизмом катализа лизоцима, по которому требуется ослабление расщепляемой связи между сахарными кольцами D и E [222]. Позднее Филлипс и соавт. получили кристаллическую структуру комплекса лизоцима с аналогом переходного состояния субстрата – тетрасахаридлактоном [223]. Плоское лактонное кольцо по своему положению оказалось близким конформации четвертого кольца D-гекса-N-ацетилглюкозамина в модельном невалентном комплексе лизоцима.

Таким образом, полученные данные, казалось бы, убедительно подтверждают распространенное и сейчас представление о том, что при

образовании комплекса Михаэлиса в молекуле субстрата за счет невалентных взаимодействий возникает значительное напряжение и происходит серьезное искажение ее конформации в направлении геометрии переходного состояния.

Предположение о том, что фермент связывает субстрат с нарушением его конформации, было впервые высказано в 1930 г. Дж. Холдейном [224] и в 1946 г. детализировано Л. Полингом [225]. В согласии с идеями Холдейна и Полинга в концепции, предложенной в 1954 г. Г. Эйрингом, Р. Ламри и Дж. Спайксом [226], фундаментальное значение в ферментативном катализе придается напряжению и принудительной деформации субстрата, возникающим при сорбции и приводящим к перераспределению электронной плотности в определенной его части. Такая трактовка механизма биологического катализа получила название концепции "дыбы", или принципа "лилипотов". Частичная дестабилизация невалентного фермент-субстратного взаимодействия приближает структуру субстрата к переходному состоянию и тем самым снижает активационный барьер и увеличивает скорость последующей стадии каталитического акта [227].

Рентгеноструктурный анализ белков и фермент-ингибиторных комплексов после классических работ Перутца, Кендрию и Филлипса стал развиваться быстрыми темпами во многих научных центрах, несмотря на то, что он по-прежнему оставался дорогостоящим, трудоемким и длительным. Через несколько лет стали известны третичные структуры химотрипсина, химотрипсина, рибонуклеазы, папаина, инсулина и многих других белков и их комплексов.

Полученные с помощью рентгеноструктурного анализа данные о пространственном строении белков оказали огромное влияние на развитие исследований во многих направлениях молекулярной биологии. Стало очевидно, что без знания пространственного строения и конформационных возможностей белков нельзя понять природу и специфику их взаимодействий с другими молекулами и, следовательно, механизм их биологического действия. Структурные исследования белков вошли в качестве необходимой составной части во все биологические исследования, ставившие перед собой достаточно серьезные цели. Они привлекли большое внимание к фундаментальному вопросу молекулярной биологии о соотношении между аминокислотной последовательностью и пространственной структурой белковых молекул.

В какой же степени новый экспериментальный материал о молекулярном строении десятка белков отвечал сложившемуся к тому времени представлению, которое так замечательно согласовалось с данными по миоглобину и гемоглобину? Детально этот вопрос рассматривается в третьей книге, специально посвященной структурной организации белков. Сейчас лишь отметим, что все последующие результаты рентгеноструктурного анализа далеко не в полной мере отвечали взглядам на пространственную структуру белковой молекулы как на ансамбль канонических регулярных форм пептидной цепи, главным образом α -спиралей и β -структур.

СОВРЕМЕННЫЕ ДОСТИЖЕНИЯ
РЕНТГЕНОСТРУКТУРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ
БЕЛКОВ²

Предыдущая глава была посвящена одному из самых выдающихся не только в биологии, но и во всем естествознании научных достижений уходящего столетия. На рубеже 1950–1960-х годов, как отмечалось, Перутц и Кендрью завершили расшифровку трехмерных структур гемоглобина и миоглобина. Тем самым они впервые решили поставленную еще четверть века до этого Берналом задачу определения с помощью рентгеновской дифракции пространственного строения белковых молекул. Труд Перутца и Кендрью означал становление нового магистрального направления в развитии биологии – морфологии элементарных биосистем, открывающей невиданные доселе возможности в познании строения живой материи. Рентгеноструктурный анализ белков после классических работ Перутца и Кендрью, а также Филлипса, установившего в 1965 г. трехмерную структуру лизоцима, стал развиваться быстрыми темпами во многих научных центрах. Спустя лишь два года после определения строения первого фермента были расшифрованы структуры рибонуклеазы А [228–230], α -химотрипсина [231] и карбоксипептидазы А [232]. К 1975 г. число белков, кристаллографические молекулярные структуры которых стали известны с разрешением $<3,5 \text{ \AA}$, достигло 79 [196]. В настоящее время оно превышает 2500 [233].

Среди многочисленных компонентов биосистемы молекулярного уровня белкам принадлежит исключительная роль в процессах, протекающих в клетках и организме. Поэтому получаемая с помощью рентгеноструктурного анализа информация о строении белков оказывает огромное влияние на развитие подавляющего большинства направлений молекулярной биологии. Давно стало очевидно, что без знания пространственной структуры белков нельзя понять природу и специфичность их взаимодействий, представить и количественно описать механизмы процессов жизнедеятельности. Рентгеноструктурное изучение белков превратилось в неотъемлемую составную часть биологических исследований; оно определяет их научный уровень и значимость получаемых результатов. Данные о расположении атомов в нативных конформациях белков служат незаменимой экспериментальной основой всех поисков решений таких фундаментальных проблем молекулярной биологии, какими являются проблемы структурной и структурно-функциональной организации белковых молекул. Первая из них заключается в установлении связи между аминокислотной последовательностью и ее пространственной физиологически активной формой и динамическими конформационными свойствами. Следовательно, она включает в себя

² Автор глубоко признателен В.З. Плетневу за помощь в подборе библиографических материалов, использованных при подготовке этой главы.

также все вопросы, касающиеся структурной ренатурации в условиях *in vitro* и свертывания синтезируемых на рибосомах полипептидных цепей в условиях *in vivo*. Вторая фундаментальная проблема, решение которой, как и первой, немыслимо без использования рентгеноструктурного анализа, направлена на выяснение зависимости между биологическими свойствами белковых молекул и их строением. Учитывая активнейшую роль белков во всех процессах жизнедеятельности, их поистине универсальные биохимические и биофизические свойства, можно утверждать, что решение отмеченных проблем в общем виде, т.е. создание теорий структурной и структурно-функциональной организации белковых молекул и соответствующих расчетных методов, будет означать становление строго количественной теоретической биологии, не уступающей в этом отношении теоретической физике. В настоящее время кристаллография белка является экспериментальной основой теоретических и эмпирических подходов к изучению структуры и функций не только отдельных молекул, но и значительно более сложных биологических систем. По прошествии более трех десятилетий со времени публикаций Перутца и Кендрью по гемоглобину и миоглобину рентгеноструктурный анализ все еще остается единственным прямым методом определения на атомном уровне пространственного строения белковых молекул и их комплексов. Многие вопросы, касающиеся достоинств и ограничений метода, его роли в развитии молекулярной биологии и применения в исследовании целого ряда конкретных направлений, обсуждаются во второй и третьей частях книги, а также в последующих томах серии.

В этой и следующей главах в краткой форме рассматриваются результаты рентгеноструктурных исследований белков, которые в чем-то, например, сложности объектов анализа, их особой познавательной ценности или прикладной актуальности, точности определения координат атомов или каких-то методологических и препаративных новшеств, являются на сегодняшний день наивысшими достижениями. Рассмотрение, вероятно, поможет составить представление о состоянии и возможностях рентгеновской кристаллографии белков первой половины 1990-х годов.

Для того чтобы с хорошим разрешением получить трехмерную структуру белка и увидеть расположение сотен или тысяч его неводородных атомов, необходимо иметь большие кристаллы с высокой степенью упорядоченности. Природа не наделила белковые молекулы свойством спонтанно создавать регулярные макроскопические структуры. В естественных условиях они не образуются; их нет в клетках и живых организмах. Поэтому получение из белков монокристаллических образцов в лабораторных условиях, как правило, – самый длительный этап рентгеноструктурного анализа, который может продолжаться годами и закончиться безрезультатно. Именно так до недавних пор завершались все попытки закристаллизовать мембранные белки, которые все это время оказывались как бы вне компетенции рентгеновской кристаллографии. Десятилетиями объектами рентгеноструктурного анализа оставались водорастворимые глобулярные белки.

3.1. МЕМБРАННЫЕ БЕЛКИ

Одно из самых значительных достижений рентгеноструктурного анализа белков последних лет, которое не может не повлиять на дальнейшее развитие биологии и становление ее новой области – молекулярной биологии клетки, состоит в начавшейся расшифровке трехмерных структур первых мембранных белков. Перед обсуждением полученных здесь результатов целесообразно кратко сообщить о том, что было известно об этих белках до исследования их с помощью рентгеновской дифракции. Если основные структурные особенности биологических мембран определяются молекулами липидного бислоя, то специфические функции мембран выполняются главным образом белками. Они ответственны за процессы превращения энергии, выступают в качестве рецепторов и ферментов, образуют каналы активного и пассивного транспорта молекул и ионов различных веществ через мембраны, охраняют организм от проникновения чужеродных антигенов и стимулируют иммунный ответ клеточного типа. В обычной плазматической мембране белок составляет около 50% ее массы. Однако в некоторых мембранах, например во внутренних мембранах митохондрий и хлоропластов, его содержание поднимается до 75%, а в других, например миелиновой мембране, снижается до 25%. Многие мембранные белки пронизывают липидный бислой насквозь и контактируют с водной средой по обеим сторонам мембраны. Молекулы этих белков, называемых трансмембранными, как и окружающие их молекулы липидов, обладают амфипатическими свойствами, поскольку содержат гидрофобные участки, взаимодействующие внутри бислоя с гидрофобными хвостами липидов, и гидрофильные участки, обращенные к воде с обеих сторон мембраны. Другая группа мембранных белков соприкасается с водой только с одной стороны бислоя [234, 235]. Одни из них погружены только во внешний или во внутренний слой мембраны, другие ассоциированы за счет невалентных взаимодействий с трансмембранными белками, третьи прикреплены к мембране с помощью ковалентно связанных с ними цепей жирных кислот, внедренных в липидный слой.

В 1979 г. было показано, что белки плазматической мембраны способны к вращательной диффузии – поворотам вокруг оси, перпендикулярной плоскости бислоя, и самопроизвольному передвижению вдоль плоскости самой мембраны, что получило название "латеральной диффузии". Однако белки не могут совершать так называемые флипплоны, т.е. переворачиваться и перескакивать с одной стороны бислоя на другую. Латеральная диффузия позволяет мембранным белкам совершать перемещения по мембране и взаимодействовать между собой, а также обеспечивает распространение мембранных компонентов из мест их синтеза в другие области клеток. Текучая структура липидного бислоя дает возможность мембранам сливаться, не утрачивая способности к регуляции их проницаемости и реализации специфических функций.

Благодаря динамическим свойствам мембран ассоциированные с

ними белки поддаются отделению от липидов. Иногда эта операция довольно проста и совершается в мягких условиях, например путем экстракции солевым раствором. Освобождаемые таким образом мембранные белки называются периферическими. В других случаях, касающихся обычно трансмембранных белков, выделение более сложно и не всегда заканчивается удачно. Многие белки, получившие по способу их очистки название "интегральных", удастся выделить только после полного разрушения бислоя с помощью детергентов и органических растворителей [236]. Детергенты – это небольшие по сравнению с белками амфипатические, дифильные молекулы (додецилсульфат натрия, тритон и др.), состоящие из полярной и неполярной частей. При смешивании детергента с мембраной неполярные, гидрофобные, концы его молекул взаимодействуют с липидами и, разрушая их ассоциацию с белками, связываются с гидрофобными участками последних, благодаря чему их полярные, гидрофильные концы оказываются ориентированными в водную среду. Солюбилизованные мембранные белки, приобретая способность растворяться в воде, переходят в раствор в виде комплексов с детергентом. При его удалении белки эту способность теряют и выпадают в осадок, образуя смесь различных белков. Как правило, мембраны предварительно прогревают до 100° в 1%-ном растворе сильного детергента, что приводит к разрушению всех нековалентных белок-белковых и белок-липидных взаимодействий. А. Гелениус и К. Симонс разработали метод разделения белков путем электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии детергента (додецилсульфата натрия) [236]. В свое время это был прорыв в исследовании мембранных белков, приведший к их химической идентификации, классификации и выделению главных белков, присутствующих в различных мембранах.

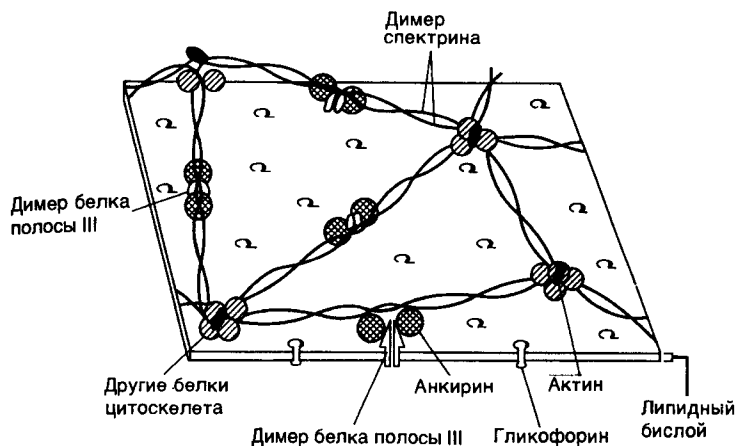
Дальнейшая работа с мембранными белками – изучение их функций, механизмов действия и пространственных структур, однако, натолкнулась на большие трудности. Оказалось, что высвобождение белковых молекул из мембраны часто сопровождается необратимой денатурацией их нативных структур и, следовательно, потерей активности. В редких благоприятных случаях при солюбилизации белков в мягких условиях и при низких концентрациях функциональные свойства не пропадают, что указывает на сохранение, по крайней мере частичное, нативных конформаций. Наиболее детальная информация о белках и липидном бислое получена при изучении плазматической мембраны эритроцитов человека, содержащих гемоглобин – немембранный белок, представленный в этих клетках в наибольшем количестве [237]. Удобство данного объекта обусловлено тем, что мембраны эритроцитов, называемые "теньями", являются единственными в клетке и их легко выделить в чистом виде с разрывом и без разрыва и даже получить вывернутыми наизнанку. При изучении теней эритроцитов впервые удалось установить, что некоторые мембранные белки пронизывают насквозь мембранный бислой, а внешняя и внутренняя стороны мембраны являются асимметричными [238]. Исследования белков плазматической мембраны эритроцитов человека

методом одномерного электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия привело к идентификации около 15 главных белков с молекулярными массами от 15 до 250 кДа. Три из них – спектрин, гликофорин и так называемый белок полосы III – составляют в сумме более 60% от массы всех мембранных белков клетки. Они по-разному связаны с мембраной и могут служить примерами трех типичных способов ассоциации белков с мембранами.

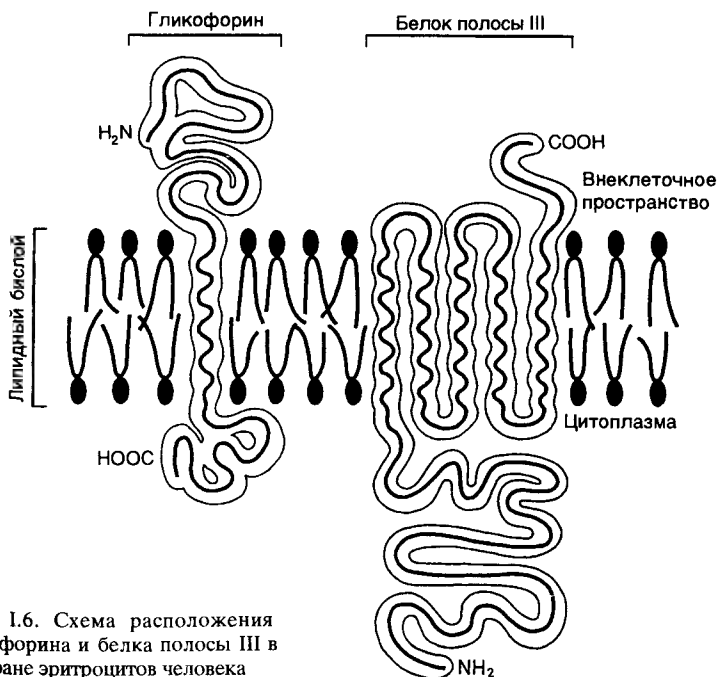
Спектрин (240 кДа) в равной мере можно считать и мембранным белком, и компонентом цитоскелета эритроцитов. Две его полипептидные цепи, закрученные друг относительно друга, образуют подвижные димеры, которые посредством взаимодействий с короткими актиновыми филаментами и другими белками объединены в тетрамеры, покрывающие плотной сетью цитоплазматическую поверхность мембраны (рис. 1.5). Структурная организация позволяет спектрину регулировать подвижность белков и их распределение в плазматической мембране [239, 240].

Гликофорин – первый мембранный белок, для которого была определена аминокислотная последовательность. Этот трансмембранный гликопротеин содержит 131 аминокислотный остаток и около 100 остатков сахара; его молекулярная масса равна 30 кДа [241]. Из рис. 1.6 видно, что большая часть полипептидной цепи гликофорина находится на наружной поверхности мембраны, где локализован гидрофильный N-концевой фрагмент. С-Концевой участок цепи, также составленный преимущественно из гидрофильных остатков, погружен в цитоплазму, а гидрофобный фрагмент в форме единичной α -спирали из 20 аминокислотных остатков пронизывает неполярный липидный бислой.

Белок полосы III из мембраны эритроцитов человека представляет собой трансмембранный белок с молекулярной массой около 100 кДа (примерно 800 аминокислотных остатков). Это транспортный белок, две молекулы которого образуют анионный канал для ионов Cl^- и HCO_3^- , пассивно перетекающих через мембрану в соответствии с градиентами их концентраций [242–244]. Полипептидная цепь белка в α -спиральной конформации несколько раз пронизывает бислой; около трети его цепи с N-конца помещена в цитоплазму, а короткий С-концевой участок расположен во внеклеточном пространстве (рис. 1.6). Для того чтобы понять механизм функционирования транспортного белка полосы III, как и механизмы действия других мембранных белков, необходимо знать трехмерную структуру молекулы в условиях липидного бислоя. Для получения такой информации требуется, на первый взгляд, почти невозможное. Во-первых, необходимо отделить трансмембранный белок от липидов и других мембранных белков, не повредив его молекулярной трехмерной структуры, что очень трудно. Во-вторых, из выделенных белковых молекул следует получить, не нарушив их пластической, легко деформирующейся при изменении внешних условий структурной организации, высокоупорядоченный монокристалл требуемых размеров, что не всегда удается даже в случае водорастворимых



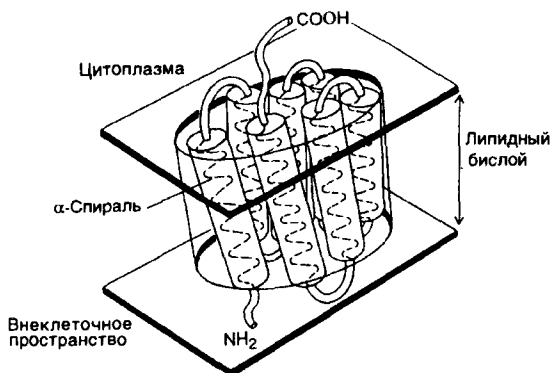
Р и с. 1.5. Схема структурной организации молекул спектрина на внутренней (цитоплазматической) поверхности мембраны эритроцитов человека



Р и с. 1.6. Схема расположения гликофорина и белка полосы III в мембране эритроцитов человека

глобулярных белков. В 80-е годы XX в. возник альтернативный подход к получению белковых объектов для рентгеноструктурного анализа, который затронул и кристаллографические исследования мембранных белков. Речь идет о генной инженерии, в основе которой лежит сайт-специфическая рекомбинация ДНК. В результате стало возможным

создавать целенаправленные, в том числе и искусственные, генетические программы и получать требуемые белки и их фрагменты в количествах, достаточных не только для научных, но и прикладных целей. Методы генной инженерии, однако, радикально не облегчили получение кристаллических образцов, построенных из нативных конформаций белковых молекул и имеющих четкие дифракционные картины. Тем не менее, появившаяся перспектива получения химически чистых мембранных белков, их мутантов и составных частей любой длины и с любой вариацией аминокислотных последовательностей, значительно расширила область поиска решений этой задачи.



Р и с. 1.7. Структура молекулы бактериородопсина в липидном бислое

До недавнего времени единственным мембранным транспортным белком, для которого были известны некоторые детали его трехмерной структуры, полученные с разрешением около $7,0 \text{ \AA}$, был бактериородопсин, обнаруженный в плазматической мембране пурпурной бактерии *Halobacterium halobium*. Его полипептидная цепь состоит из 248 остатков. В каждой молекуле бактериородопсина имеется одна поглощающая свет простетическая группа – ретиналь, идентичный хромофору родопсина палочек сетчатки глаза у позвоночных. Бактериородопсин работает как фотоактивируемый протонный насос. При активации одним квантом света возбужденный хромофор вызывает конформационные изменения в белке, в результате чего два протона переносятся с внутренней поверхности клетки на наружную. В мембране создается градиент концентрации протонов и градиент электрического потенциала, которые обуславливают синтез АТФ. Молекулы бактериородопсина в мембране образуют плоскую кристаллическую решетку, подобную двумерному кристаллу. Р. Хендерсон и П. Анвин [245] использовали для определения трехмерной структуры белка и его ориентации в мембране сочетание методов электронной микроскопии низкой интенсивности (см. гл. 6) и малоуглового рентгеновского рассеяния. В результате рекордной для обоих методов точности идентификации пространственного строения молекулы было показано, что полипептидная цепь бактериородопсина образует в мембране семь α -спиралей, каждая из которых содержит около 30 аминокислотных остатков (рис. 1.7). Все спирали пересекают липидный бислой примерно

под прямым углом к плоскости мембраны. Они плотно упакованы и не оставляют места в канале для молекул воды. Поэтому протоны, по-видимому, проходят через мембрану по цепочке взаимодействующих друг с другом белковых цепей α -спиральных остатков, действие которых инициируется возбужденным хромофором.

Значительная часть мембранных белков является рецепторами, т.е. аллостерическими белками, обладающими способностью при взаимодействии с гормонами – специфическими сигнальными медиаторами – определенным образом перестраивать пространственную структуру молекулы. Аллостерическое изменение конформации передается по трансмембранной цепи сопряженных белков или доменов одного большого белка внутрь клетки, достигает воспринимающей посланный сигнал системы и стимулирует в ней соответствующий физиологический процесс. Имеющаяся информация о трехмерных структурах рецепторов и других составляющих трансмембранных белков крайне скудна. До недавнего времени удалось получить кристаллы и определить структуру только двух специфических мембранных рецепторов, фоторецепторного центра и порина [246–248]. В 1990-е годы исследования рецепторных белков начинают приобретать систематический характер. Полученные к настоящему времени сведения об их пространственном строении, как показано ниже, относятся не к структурам целых мембранных рецепторов, а лишь к внешним частям молекул, внеклеточным доменам.

Структура комплекса гормона роста человека (hGH) с внешней частью рецептора (hGHbp). А. де Вас и соавт. методом рентгеновской кристаллографии с разрешением 2,8 Å установили пространственное строение белкового комплекса лиганда hGH с внеклеточным доменом рецептора hGHbp, взаимодействие которых активизирует рост и метаболизм клеток мышечной, хрящевой и костной тканей [249]. Молекула мембранного рецептора hGHbp состоит из трех пространственно четко разделенных друг от друга частей: внеклеточного, расположенного на внешней стороне мембраны, гормонсвязывающего фрагмента из 246 аминокислотных остатков, пронизывающего липидный бислой трансмембранного сегмента и внутриклеточной части, функция которой пока не ясна. Отсутствует также четкое представление о механизме взаимодействия всех частей между собой и передаче сигнала, следующего за ассоциацией гормона с внешней частью рецептора, внутрь клетки.

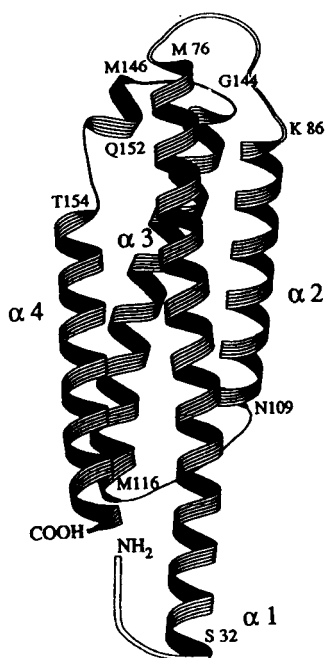
Рентгеноструктурный анализ гормон-рецепторного комплекса показал, что внеклеточная белковая цепь молекулы hGHbp образует два хорошо различимых домена, состоящих из фрагментов 1–123 и 128–238, соединенных лабильным участком 124–127. Каждый домен содержит семь β -тяжей, образующих сэндвичевую структуру. Большое значение в реализации гормональной функции авторы [249] отводят С-концевому октапептидному участку 239–246. При сорбции субстрата он обеспечивает необходимую для образования эффективных невалентных контактов конформационную подвижность двум доменам

рецептора. Помимо этого, он способствует сближению внеклеточной части одного рецептора с такой же частью другого и тем самым привлекает два аналогичных внешних домена последнего к связыванию гормона. В результате образуется комплекс $hGH(hGHbp)_2$, в котором оба рецептора взаимодействуют с гормоном практически одинаково, несмотря на то, что два центра связывания молекулы hGH с парами доменов двух рецепторов не имеют полного структурного сходства. Пространственное строение комплекса $hGH(hGHbp)_2$ внешне напоминает комплекс антигена с двумя парами доменов (Fab) иммуноглобулина.

Структура внеклеточного домена аспартатного рецептора бактерии *Salmonella typhimurium* и его комплекса с лигандом. Пространственное строение домена в свободном состоянии рецептора и ассоциированном с аспартатом было определено М. Мильбурном и соавт. с разрешением 2,4 и 2,0 Å соответственно [250]. Молекула аспартатного рецептора, типичного трансмембранного белка, состоит из трех частей: внешнего лигандсвязывающего домена, цитоплазматического сигнального домена и находящегося в липидном бислое промежуточного домена [251–254]. Периплазматический участок белковой последовательности 31–188, содержащий Asp-связывающий центр, соединен двумя пронизывающими мембрану пептидными фрагментами 7–30 и 189–212 с внутренним, самым большим доменом, который образуют остатки 1–6 и 213–552 [255, 256]. Аминокислотная последовательность внеклеточного домена 31–188 была синтезирована генно-инженерным методом [257]. Очищенный полипептид кристаллизовался исключительно в виде димера, обладавшего тем же сродством к аспартатному лиганду, что и весь белок дикого типа. Дифракционная картина, имевшая вначале диффузный характер, приобретала более резкие очертания при сшивке двух цепей димера посредством дисульфидной связи, образованной остатками Cys в положениях 25 и 35. Приготовленный таким образом препарат по своим функциональным свойствам не отличался от домена нативного рецептора.

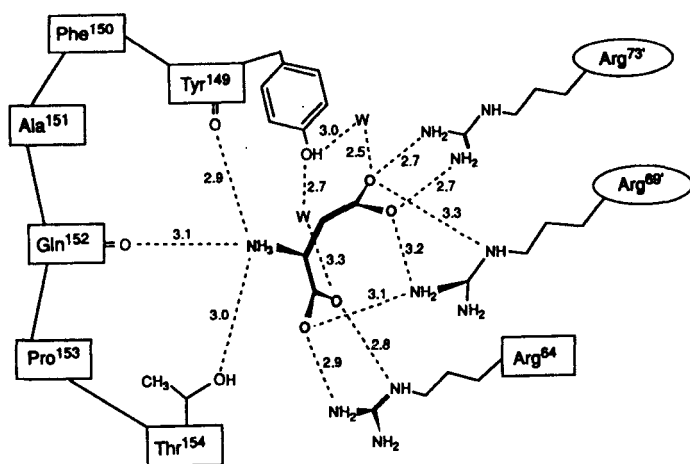
Трехмерные структуры субъединиц димера, не ассоциированного с лигандом, идентичны и имеют вид, схематически представленный на рис. I.8. Каждая из них состоит из четырех α -спиралей, образующих цилиндр диаметром около 20 Å и длиной более 70 Å. Дисульфидсвязанный димер принадлежит к группе симметрии C_{2v} . При взаимодействии с лигандом и комплексообразовании симметрия нарушается. Центр связывания аспартата с рецептором находится вблизи вершины димера между контактными поверхностями субъединиц на высоте более 60 Å от предполагаемой поверхности внешнего фосфолипидного слоя мембраны. В соответствии со своей симметрией димер, образованный из внеклеточных доменов двух рецепторов, имеет два лигандсвязывающих гидрофильных кармана. Один из них, наиболее четко проявляющийся на картах электронной плотности, показан на рис. I.9. Он включает остаток Arg-64 и фрагмент 149–154 одной субъединицы и остатки Arg-69, Arg-71 – другой, а также молекулу кристаллизационной

Р и с. 1.8. Ленточная схема трехмерной структуры внеклеточного домена аспартатсвязывающего рецептора [250]



Р и с. 1.9. Схема водородных связей аспарагиновой кислоты с лигандсвязывающим центром, образованным внеклеточными доменами двух аспартатных рецепторов [250]

Аминокислотные остатки одного из них заключены в прямоугольные рамки, а другого — в овалы



воды, которые в лиганд-рецепторном комплексе образуют с аспартатом сложную сеть водородных связей. Сорбция двух молекул аспартата вызывает сближение остатков, формирующих гидрофильные карманы, и общее уплотнение димерного комплекса. Среднеквадратичное отклонение атомов C^{α} одной субъединицы (без учета фрагмента 77–85) составляет 0,47 Å, а атомов C^{α} второй субъединицы (без учета фрагмента

25–36) – 0,34 Å. Отклонения C^{α} на участках 77–85 и 25–36 заметно превышают указанные величины. Конформационные изменения димера при аспартатном связывании приводят к вращению субъединицы на 4° относительно короткой оси, которая приблизительно перпендикулярна оси второго порядка и контактирующим поверхностям лигандсвязывающих доменов. В какой мере отмеченные конформационные отклонения отражают целенаправленный аллостерический эффект рецептора осталось пока невыясненным.

Структура простагландин- H_2 -синтазы (PGHS). Вырабатываемые железами внутренней секреции гормоны попадают в кровь и с ее током достигают различных органов и тканей. Поэтому для них, помимо исключительной специфичности и высокой активности, характерна удаленность действия от мест синтеза. В организме, кроме гормонов, есть и другие сигнальные медиаторы, которые секретируются не в кровь, а во внеклеточную периплазматическую жидкость и оказывают влияние на состояние только ближайших клеток. Важным семейством таких локальных химических медиаторов, источником которых являются клетки многих типов, служат простагландины – производные жирных кислот с 20 атомами углерода в цепи. Они связываются с большим числом рецепторов клеточной поверхности и вызывают сокращение гладких мышц, снижают способность тромбоцитов к агрегации, активизируют центральную нервную систему, действуют на воспалительные процессы и высвобождают ренин [258]. Недавно было установлено, что простагландины играют также важную роль в патофизиологии рака и при сердечно-сосудистых заболеваниях [259, 260]. В отличие от большинства сигнальных молекул они не накапливаются в клетках, а непрерывно синтезируются в мембранах из предшественников и сразу же освобождаются во внеклеточное пространство, где в течение короткого времени (от долей секунды до двух минут) разрушаются. Уменьшение локальной концентрации простагландинов вне клеток активирует работу синтезирующих их ферментов, что по механизму обратной связи оказывает воздействие на состояние клеток, выделяющих простагландины, и на их ближайших соседей.

Кристаллографическая структура молекулы первого мембранного фермента, простагландин- H_2 -синтазы (PGHS), была впервые установлена в 1994 г. Д. Пико и соавт. [261]. Белок катализирует два процесса на первой стадии биосинтеза простагландинов. Он инициирует и активирует циклооксигеназную реакцию, по ходу которой арахидоновая кислота превращается в простагландин PGG_2 , и последующую пероксидазную реакцию, при которой PGG_2 переходит в PGH_2 , быстро трансформирующийся в один из простаноидов. PGHS – интегральный мембранный белок, локализованный преимущественно в эндоплазматическом ретикулуме. Его освобождение от мембраны проводится экстракцией солевым раствором и солюбилизацией неионным детергентом, в присутствии которого осуществляется также кристаллизация. В полученном образце белковые молекулы ассоциированы с флурбипрофеном, нестероидным противовоспалительным препаратом, и

образуют димерные комплексы с осью симметрии второго порядка. В клетках обнаружены два изомера простагландин- H_2 -синтазы, PGHS-1 и PGHS-2, которые отличаются своей активностью и тканевым распределением. В работе [261] с разрешением 3,5 Å идентифицирована трехмерная структура PGHS-1 овцы – гликозилированного белка с молекулярной массой ~70 кДа и 587 аминокислотными остатками. Он участвует в системе межклеточных взаимодействий, способствуя поддержанию тканевого гомеостаза. Что касается функции PGHS-2, то предполагается, что фермент ответственен за биосинтез простагландинов при делении клеток и воспалительных процессах.

Пространственная структура молекулы PGHS-1 состоит из трех достаточно автономных и, по-видимому, независимо свортывающихся субъединиц: малого N-концевого домена, мембраносвязанного участка цепи и ферментного домена. Первый N-концевой домен образован участком полипептидной цепи 33–72 (остатки 1–24 являются отщепляемой сигнальной последовательностью и не входят в зрелый фермент; остатки 25–32 не могли быть интерпретированы по полученным картам электронной плотности). Его конформация, стабилизированная тремя внутридоменными дисульфидными связями, близка структуре эпидермального фактора роста (EGF). Полипептидные модули, подобные EGF, найдены во многих внеклеточных белках – факторах свертывания крови, стимулирующих рост нейронов, а также в белках поверхностных клеток, необходимых для их выживания и пролиферации. Функция EGF-подобного домена молекулы PGHS-1 неизвестна. Второй домен, включающий остатки 73–116, состоит из четырех α -спиралей, ориентированных вдоль одной стороны мономера. Его конформация, высокая амфипатичность и профиль гидрофобной поверхности свидетельствуют о возможной интеграции фермента только в один липидный слой, и поэтому данный мембранный белок, согласно классификации Г. Блобеля, является монотопным [262]. Третий, самый большой каталитический домен молекулы PGHS-1 (остатки 117–587) обладает глобулярной структурой, состоящей из двух закрученных друг относительно друга и тем не менее четко различаемых лепестков. Один из них, наиболее крупный, имеет "V"-образную форму, построенную из двух α -спиралей, скрепленных, подобно лапкам пинцета, промежуточной третьей спиралью. Эта конструкция служит каркасом, вокруг которого упакованы еще четыре α -спирали и соединяющие их петли. Малый лепесток каталитического домена представляет собой пакет из шести приблизительно параллельных спиралей.

Белок PGHS-1, бифункциональный фермент, располагает двумя активными центрами: пероксидазным и циклооксидазным. Первый находится на поверхности узкой щели между большим и малым лепестками каталитического домена и содержит простетическую группу – высокоспиновый Fe(III)-протопорфирин IX, проксимальная поверхность которого обращена к малому лепестку. Пероксидазная активность сводится к восстановлению синтезированного в циклооксидазном центре PGG₂ и активации циклооксидазной реакции. Такой механизм типичен

для гемзависимых пероксидаз, восстанавливающих гидропероксидазные субстраты путем реакции двухэлектронного переноса, приводящего к образованию оксоферрилпорфин-катионрадикала. Окисленный гем возвращается в свое первоначальное состояние при двух последовательных одноэлектронных переходах к восстанавливающимся субстратам или благодаря переходу кислорода к арилсульфидным соединениям. Молекулы PGHS-1 преимущественно восстанавливают PGG₂ и другие длинноцепочечные жирные кислоты, а также алифатические гидропероксидазы. Циклооксидазный активный центр представляет собой длинный узкий канал ($8 \times 25 \text{ \AA}$), идущий от внешней поверхности мембраносвязанного домена через его спирали к центру мономерной молекулы PGHS-1. Наблюдаемая нечеткая дифракционная картина рассеяния рентгеновских лучей кристаллами, выращенными пока что только для единственного фермент-ингибиторного комплекса, не позволила авторам предложить на основе полученных ими данных механизм каталитической реакции, протекающей в циклооксидазном центре [261].

Завершая краткое рассмотрение результатов рентгеноструктурного анализа простагландин-Н₂-синтазы, следует отметить, что значение этой работы, как первого исследования трехмерной структуры мембранного фермента, заключается не только в самих экспериментальных фактах, впервые ставших известными, ценность их очевидна. Не меньшее ее значение связано с влиянием полученных данных на постановку вопросов, на качественно ином, более высоком уровне. Поиски решений таких важных вопросов как встраивание ферментов в мембраны, функции EGF-подобного модуля, конформационные и химические аспекты каталитических актов, совершаемых в циклооксидазных и пероксидазных активных центрах и ряда других, представляющих общий интерес, теперь могут опираться на хотя и не в полной мере достаточные, но конкретные количественные структурные данные.

3.2. БЕЛКИ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ

Несмотря на то, что белки клеточной иммунной системы являются мембранными белками, тем не менее, принимая во внимание их функциональные особенности, целесообразно рассмотреть последние достижения рентгеноструктурного анализа в изучении их пространственного строения в отдельном разделе.

В 1960-х годах было установлено, что два основных типа иммунных реакций осуществляются различными видами лимфоцитов, Т и В. Ответственные за клеточный иммунитет Т-лимфоциты размножаются в тимусе, центральной лимфоидной ткани. В-лимфоциты, вырабатывающие антитела и ответственные за гуморальный ответ, образуются у млекопитающих из стволовых клеток кроветворной ткани, а у птиц – в фабрициевой сумке. Далее они мигрируют с током крови в периферические лимфоидные ткани, где и становятся Т- и В-лимфоцитами. Иммунный ответ клеточного типа означает пролиферацию специа-

лизированных клеток, реагирующих на чужеродные антигены, которые разрушаются или непосредственно на поверхности образовавшихся клеток, или с помощью других клеток, таких как макрофаги. Гуморальный ответ заключается в активации синтеза антител, циркулирующих в жидких средах организма и специфически взаимодействующих с чужеродными молекулами. Связывание антитела с антигеном облегчает поглощение последнего фагоцитами и часто активирует особую систему белков крови, систему комплемента, которая способствует разрушению антигена [263, 264].

Среди множества проблем иммунологии, одну из них, если иметь в виду прежде всего чисто познавательный аспект этой области биологических знаний, следует отнести к самой фундаментальной, поскольку во многом она определяет возможность решения остальных. Эта проблема связана с изучением на атомно-молекулярном уровне механизмов узнавания и ответных реакций иммунной системы на появление в организме инфекционных антигенов – чужеродных белков, вирусов, бактерий, патогенных веществ. Важный шаг в познании принципов функционирования иммунной системы был сделан в 1959 г. Ф. Бернетом, разработавшим так называемую теорию клональной селекции, которая и по сей день пользуется всеобщим признанием [265]. Первоначально теория имела сугубо гипотетический характер. Однако заложенные в ней идеи оказались плодотворными и она вскоре смогла стать для экспериментальных исследований не только системой основополагающих научных принципов, но и конкретной программой поиска. В настоящее время эта программа выполнена и сегодня теория клональной селекции представляет собой скорее констатацию надежно установленных фактов, чем концептуальную основу дальнейшего развития иммунологии [266]. Специфичность антигенной реакции лимфоцитов, согласно теории Бернета, обусловлена наличием на поверхности Т- и В-клеток рецепторных белков, избирательно взаимодействующих с определенными антигенами. Связывание с ними рецепторов активирует клетку и вызывает ее эффективное размножение. Таким образом стимулируется пролиферация лимфоцитов, содержащих на своих поверхностях именно те рецепторы, которые, с одной стороны, комплементарны чужеродному антигену, а с другой – могут адекватно сигнализировать клетке о необходимости антиген-специфичного ответа. По теории клональной селекции иммунную систему образуют миллионы различных клеточных семейств или клонов, каждый из которых состоит из Т- или В-лимфоцитов, имеющих общих предшественников. Так как во всех случаях клетка-предшественница детерминирована к синтезу определенного антиген-специфичного белка рецептора, то все клетки одного клона имеют одинаковую антигенную специфичность и, следовательно, могут ответить на сигнал рецептора только одним, присущим клеткам лишь данного клона, способом. Антигенами, как правило, являются белки и полисахариды. На поверхности этих молекул имеются участки, называемые антигенными детерминантами или эпитопами, которые предрасположены к взаимодействиям с антигенсвязывающим участком антитела В-лимфоцита или

рецептора Т-лимфоцита. Большинство антигенов обладают наборами таких детерминант, стимулирующих в первом случае гуморальный иммунный ответ, а во втором – иммунный ответ клеточного типа. Даже одиночная антигенная детерминанта может активировать много различных клонов с поверхностными рецепторами, обладающими разным родством к данной детерминанте. Имеющаяся информация о Т-клетках и механизмах протекающих в них защитных реакций несравненно беднее, чем о В-клетках. Такая ситуация объясняется прежде всего отсутствием вплоть до последних лет данных о пространственном строении мембранных рецепторов Т-лимфоцитов, играющих ключевую роль в клеточном иммунном ответе.

Известно, что Т-лимфоциты при стимуляции антигеном начинают интенсивно делиться и превращаться в активные клетки-эффекторы. В зависимости от выделяемых ими на клеточной поверхности антител они могут быть разделены по крайней мере на три группы [267]. Первую группу составляют цитотоксические клетки, которые, реагируя с чужеродными вирусными антигенами, убивают зараженные клетки до начала репликации вируса. Молекулярный механизм, обуславливающий гибель клетки-мишени, пока не выяснен. Тем не менее известно, что для этого необходим непосредственный контакт между цитотоксическим Т-лимфоцитом – клеткой-киллером и инфицированной клеткой – клеткой-мишенью [268]. Во вторую группу активированных Т-лимфоцитов входят так называемые Т-хелперы, клетки-помощники, необходимые как В-клеткам, так и Т-клеткам для создания соответственно гуморального и клеточного иммунного ответов, а также активации макрофагов [269, 270]. Наконец, третью группу образуют Т-супрессоры, способные подавлять ответы В-клеток или других Т-клеток на антигены. Замечено, что Т-супрессоры, как и большинство Т- и В-лимфоцитов, функционируют только в том случае, если их непрерывно побуждают к этому Т-хелперы, которые, активируя Т-клетки супрессора, сами ингибируются. Такая обратная связь в сложной сети взаимодействий лимфоцитов обеспечивает саморегуляцию активности клеток обоих типов [271].

Большая часть Т-лимфоцитов узнает чужеродные агенты, если они ассоциированы на клеточных поверхностях с мембранными гликопротеинами, которые кодируются генами главного комплекса гистосовместимости (major histocompatibility complex, МНС) [272]. Существуют два класса молекул МНС, I и II, каждый из которых представляет собой набор гликопротеинов клеточной поверхности. Цитотоксические Т-клетки в трансплантационных реакциях отвечают в основном на чужеродные гликопротеины класса I, а Т-хелперы – класса II [273–275]. Гликопротеины МНС класса I кодируются тремя отдельными генетическими локусами, каждый из которых ответственен за одну полипептидную цепь с молекулярной массой ~45 кДа (345 аминокислотных остатков). Все три последовательности – трансмембранные белки, состоящие из короткого гидрофильного С-концевого фрагмента, расположенного внутри клетки, гидрофобного участка, пронизывающего липидный бислой плазматической мембраны, и длинной, составляющей

около 80% общей массы белка, N-концевой гликозилированной аминокислотной последовательности. Белки МНС класса I имеются на поверхности почти всех соматических клеток и могут составлять до 1% белков плазматической мембраны ($5 \cdot 10^5$ молекул на клетку). Они образуют невалентные комплексы с небольшим белком – β_2 -микроглобулином, гомологичным отдельному домену иммуноглобулина.

Локусы, кодирующие гликопротеины МНС класса I, наиболее полиморфны из всех известных у высших позвоночных нуклеотидных последовательностей. Столь же многочисленны, следовательно, и белки МНС. Однако их разнообразие имеет иную природу, чем разнообразие антител. Хотя у одного вида организмов в целом могут встречаться сотни различных белков данного класса, данная особь наследует лишь по одному аллелю каждого локуса от одного из родителей, и у нее могут быть максимум две разные формы каждого гликопротеина. В отличие от этого антитела представлены у отдельной особи миллионами различных вариантов [273, 276].

Гликопротеины антигенов МНС класса II также полиморфны. Они отличаются от белков МНС класса I тем, что не так широко распространены в тканях; их можно встретить в большинстве В-лимфоцитов, у некоторых Т-лимфоцитов, макрофагах и макрофагоподобных клетках. Белки МНС этого класса состоят из двух невалентно связанных полипептидных α - и β -цепей с молекулярными массами 33 и 28 кДа соответственно. Обе цепи пронизывают плазматическую мембрану; их N-концевые участки, составляющие большую часть последовательностей, гликозилированы и располагаются во внеклеточном пространстве [277–279].

Узнавание Т-лимфоцитами антигена, ассоциированного с гликопротеинами МНС на поверхности клетки-мишени, осуществляется Т-клеточным антигенным рецептором (TCR) и одним из трансмембранных белков, CD4 или CD8, являющихся корецепторами TCR. Предполагается, что невалентный комплекс образуется за счет стабилизирующих контактов между вариабельными участками молекулы TCR, антигеном и полиморфными участками МНС, а также между мембранным белком CD4 (или CD8) и неполиморфными областями МНС класса II (или класса I соответственно). Для скоординированных взаимодействий TCR и CD4 (или CD8) с белками МНС клеток-мишеней требуется определенная совокупность свойств Т-клеток, которые появляются во время развития лимфоцитов в тимусе, их дифференциации и созревания.

Во время пребывания лимфоцитов в тимусе для созревания отбираются только те Т-клетки, которые могут управлять своим МНС. Этот процесс известен как позитивная селекция. Полагают, что он возникает в результате таких взаимодействий тимоцитов TCR⁺, CD4⁺ и CD8⁺ с МНС, при которых те тимоциты, чьи Т-клеточные рецепторы узнают МНС класса I, исключают экспрессию белков CD4, а тимоциты, распознающие МНС класса II, исключают экспрессию CD8. Таким образом осуществляется отбор реагирующих на белки МНС-I и МНС-II Т-клеток, связанных соответственно с линиями CD8 и CD4

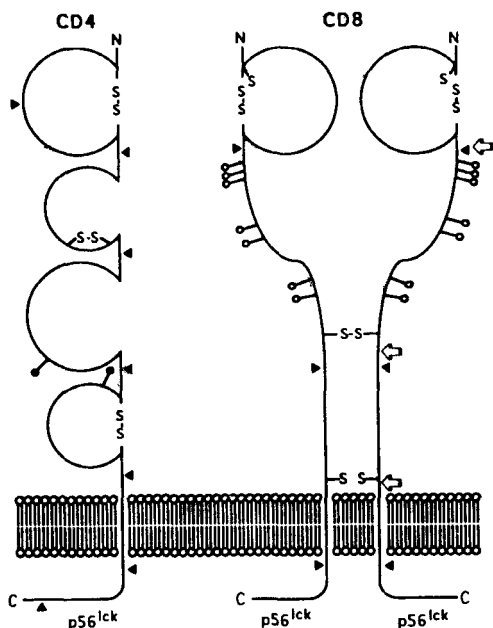
[280–282]. Зрелые Т-клетки, имеющие CD8, узнают антиген, связанный с белками МНС класса II. Первые – это клетки-киллеры или Т-цитотоксические клетки, вторые – Т-хелперы [283–285]. Итак, функционирование белка CD8 обусловлено его ассоциацией с неполоморфными областями молекул МНС-I клетки-мишени [286, 287]. С помощью мутационного анализа была идентифицирована гептапептидная последовательность $\alpha 3$ домена МНС класса I, с которой связывается CD8 [288, 289]. Экспериментально показано, что белки CD8 и TCR узнают различные домены молекулы МНС-I. Следовательно, Т-клеточная активация может включать образование тройного комплекса, в котором находящиеся на Т-клеточной поверхности CD8 и TCR ассоциированы с одной и той же молекулой МНС-I клетки-мишени. По всей видимости, взаимодействие CD8 с молекулами МНС-I запускает внутриклеточную сигнальную систему через белок $p56^{lck}$, связывающую тирозинкиназу, непосредственно ассоциированную в липидных клетках как с CD4, так и CD8 [290]. В этом случае комплекс CD8– $p56^{lck}$ может функционировать практически тем же путем, что и рецепторы фактора роста, в которых связь с внутриклеточным доменом активирует внутриклеточную тирозинкиназу.

К представленному выше материалу о Т-лимфоцитах кристаллография белков прямого отношения не имела. В значительной мере поэтому почти все то, что было сказано о функционировании Т-клеток, молекулярных структурах поверхностных белков и их комплексов, природе и побудительных мотивах антитело-антигенных взаимодействий, работе сигнальных систем и регуляторных механизмов носит общий, феноменологический и предположительный характер. Рентгеновские данные о трехмерных структурах мембранных белков и их отдельных доменов, участвующих в функционировании Т-клеточной иммунной системы, начали появляться лишь в 1990-х годах. Поскольку речь идет главным образом о структурах мембранных белков, то использование метода рентгеновской дифракции в клеточной иммунологии сталкивается с большими препаративными трудностями, не в полной мере еще преодоленными. Впрочем, аналогичная ситуация и во всех других направлениях молекулярной биологии, имеющих дело с изучением явлений, протекающих на поверхности клеток. Поэтому при оценке обсуждаемых ниже конкретных результатов рентгеноструктурного анализа следует учитывать, что они означают только обнадеживающее начало широкого проникновения метода в проблематику Т-клеточной иммунологии.

Структура внеклеточного фрагмента корцептора CD8 Т-лимфоцитов. Белок CD8 обнаружен на поверхности Т-клеток в виде двух форм: дисульфидсвязанных гомодимера α_2 и гетеродимера $\alpha\beta$ [266]. Обе формы имеют N-концевые внеклеточные домены, которые по аминокислотным последовательностям и структурным особенностям подобны варибельным доменам иммуноглобулина Ig-V [291, 292]. Схематически гомодимер α_2 CD8 представлен на рис. 1.10 [293]. Внеклеточная область CD8 включает 162 остатка, из которых 114 образуют N-концевой иммуноглобулиновый домен, соединенный с трансмемб-

Р и с. 1.10. Схемы рецептора CD4 и гомодимера рецептора CD8 [293]

Каждый большой круг соответствует иммуноглобулиновому домену; маленькие светлые кружки означают потенциальные места О-гликозилирования, а темные — N-гликозилирования



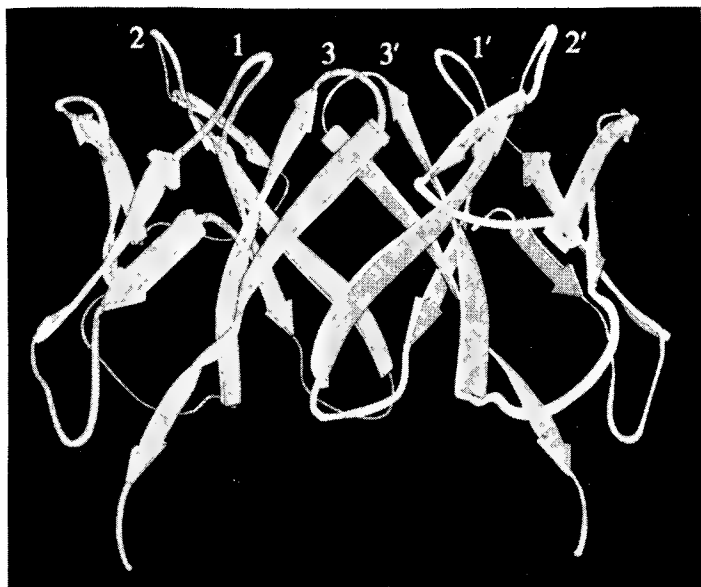
ранным участком цепью из 48 остатков. Внутриклеточная область состоит из высокополярной аминокислотной последовательности, непосредственно взаимодействующей с тирозинкиназой $p56$. Трехмерная структура большей части внеклеточной полипептидной цепи корецептора человека CD8 протяженностью в 146 остатков (CD8-146) была установлена Д. Лихи, Р. Акселем и У. Хендриксоном с разрешением $2,6 \text{ \AA}$ [293]. Использованные для определения структуры кристаллы имели необходимые размеры и давали удовлетворительную дифракционную картину только после обработки белкового препарата нейрамидазой, О-гликозидазой и V8-протеиназой. В найденной структуре CD8-146 общий характер свертывания полипептидной цепи N-концевого домена оказался идентичным вариабельным доменам иммуноглобулина Ig-V. Его пространственная структура также содержит, как видно из рисунка, два антипараллельных β -складчатых листа из пяти и четырех β -тяжей, соединенных петлями той же топологии. Два домена фрагмента CD8-146 образуют подобный иммуноглобулину F_v гомодимер с осью симметрии второго порядка. Карты электронной плотности, однако, не позволили идентифицировать геометрию следующего за N-концевым доменом фрагмента 115–141. Отсутствие в дифракционной картине соответствующих четких рефлексий свидетельствует о неупорядоченном состоянии этого фрагмента в кристалле.

Совместное рассмотрение ставшего известным пространственного строения домена CD8 и установленной ранее П. Бьеркманом и соавт. [294] кристаллографической структуры белка МНС класса I (HLA-A2) выявило наличие стерической и электростатической дополнительности

профилей потенциальных поверхностей обоих полипептидов, и позволило воссоздать их невалентный комплекс и сконструировать соответствующую атомную модель. Двойной комплекс был дополнен еще одним участником – Т-клеточным рецептором (TCR), поверхность которого, по-видимому, комплементарна остающемуся вакантным пептидсвязывающему желобу молекулы HLA-A2 клетки-мишени. Таким образом, авторы работы [293] пришли к выводу, что в анти тело-антигенном комплексе двух клеток домен CD8 и TCR одновременно связаны с одной и той же молекулой MHC-I, а второй домен димера CD8 – с другой молекулой MHC-I. Такая схема взаимодействий рецепторов клетки-киллера с молекулами MHC-I клетки-мишени согласуется с экспериментальными данными, полученными Р. Солтером и соавт. [295].

Структура внеклеточного фрагмента рецептора CD4, содержащего домены 3 и 4. Ранее полагали, что пространственное строение молекул рецепторов CD4 и CD8 близко, а поэтому их взаимодействия с молекулами MHC классов I и II должны оказывать одинаковое воздействие на активацию и развитие Т-лимфоцитов [296]. Однако кристаллографические исследования CD4 [297–300] и CD8 [293] показали, что трехмерные структуры этих белков, во всяком случае во внеклеточной области, существенно отличаются друг от друга. Главные различия касаются следующих двух моментов. Во-первых, N-концевой Ig-V-подобный домен CD4 функционирует в мономерном состоянии, а N-концевой домен CD8 образует F_v-подобный гомодимер (рис. I.10). Во-вторых, структура CD4 во внеклеточной области состоит из четырех, в значительной мере автономных доменов, а CD8 – только из одного домена, который соединен с трансмембранной частью рецептора практически ненаблюдаемым в дифракционной картине и, по-видимому, лабильным участком из 48 аминокислотных остатков. Единственная структурная особенность, присущая как CD4, так и CD8, и отсутствующая в иммуноглобулиновых варибельных доменах, заключается в большей на 6 аминокислотных остатков длине петли CDR2 (рис. I.11). Функциональное значение такого локального изменения последовательности остается неясным. Остановимся более подробно на пространственном строении рецептора CD4.

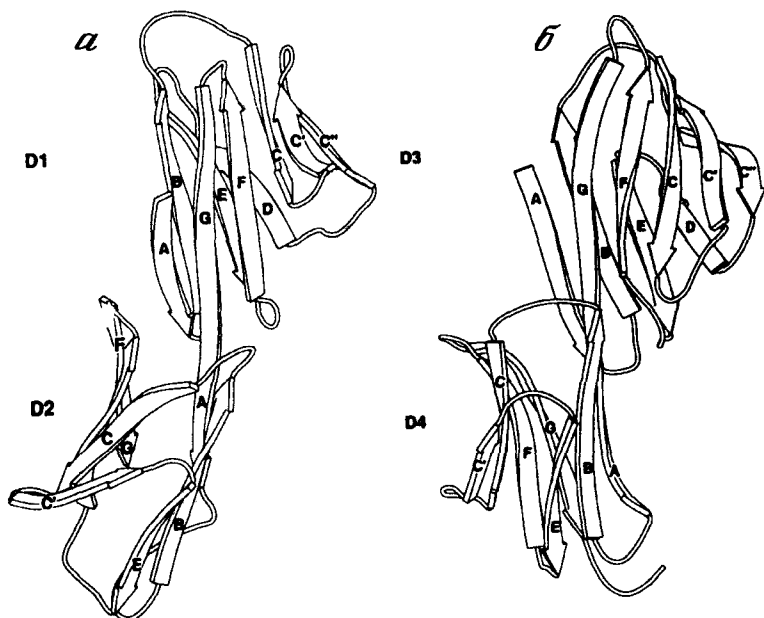
Молекула CD4 – трансмембранный гликозилированный белок. Он находится на поверхности Т-лимфоцитов той субпопуляции, которая распознает клетки-мишени с антигенами, ассоциированными с белками MHC класса II [301–303]. Цитоплазматическая область CD4 тесно контактирует с тирозинкиназой р56, играющей важную роль в запуске производства Т-клеток (рис. I.10). Молекула CD4 является основным рецептором, взаимодействующим с вирусом иммунодефицита человека (HIV-1) [304–307], о чем подробно говорится в следующем разделе. На основе данных анализа аминокислотных последовательностей CD4 и иммуноглобулинов было предсказано, что внеклеточная часть рецептора состоит из четырех доменов, отнесенных к суперсемейству IgSF [304, 308]. Предположение вскоре подтвердилось результатами прямых



Р и с. I.11. Ленточная схема трехмерной структуры гомодимера CD8aD1 [293]

Цифрам 1, 2, 3 и 1', 2', 3' обозначены CDR1-, CDR2- и CDR3-подобные петли двух субъединиц

структурных исследований. Правда, все попытки провести рентгеноструктурный анализ целой внеклеточной части молекулы из 371 остатка не увенчались успехом из-за ее плохой кристаллизации. Однако удалось получить кристаллы, дающие удовлетворительную картину рентгеновской дифракции, которые образовывались из двух половин этой части последовательности CD4 по отдельности. Каждый из кристаллических образцов включал по два домена – D1D2 [298, 299] и D3D4 [297, 300]. В кристаллографическом анализе D3D4 была использована криотехника, которая позволила установить трехмерную структуру с разрешением 2,6 Å; при комнатной температуре разрешение составляло 2,8 Å. Замораживание кристаллов до -150° сопровождалось 1–2%-ным уменьшением размеров элементарной ячейки без нарушения симметрии пространственной группы. Среднеквадратичное отклонение атомов C^{α} аминокислотных остатков при изменении температуры от комнатной до -150° оказалось равным 0,86 Å (0,93 для домена D3 и 0,57 Å для D4). Трехмерные структуры четырех доменов схематически представлены на рисунке I.12. Сопоставление показывает, что пространственное строение двухдоменных последовательностей имеет ряд общих черт, причем домен D1 обладает большим сходством с D3, а D2 – с D4. Различия в геометрии D3D4 по сравнению с D1D2 заключаются, во-первых, в увеличенном расстоянии у D3 между β -складчатыми листами, что, очевидно, связано с отсутствием в этом домене дисульфидной связи, и, во-вторых, в изменении приблизительно



Р и с. 1.12. Ленточная схема трехмерных структур доменов D1D2 (а), D3D4 (б) внеклеточной части рецептора CD4 [297]

на 25° взаимной ориентации доменов D3 и D4 относительно ориентации D1 и D2.

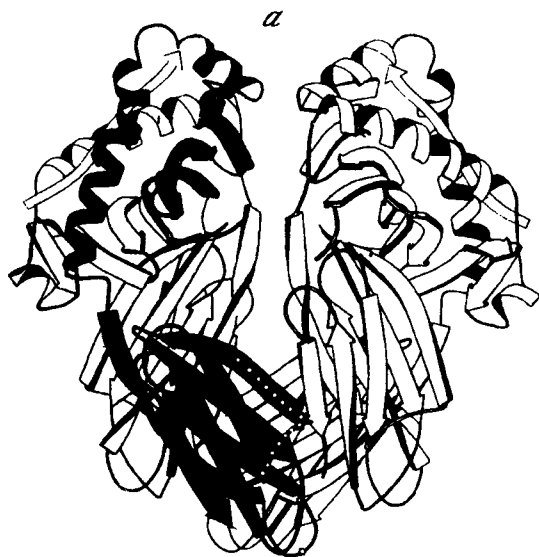
В модели всей внеклеточной части рецептора CD4, предложенной Г. Ланге и соавт. [297] на основе известных трехмерных структур D1D2 и D3D4 и согласующейся с рядом косвенных данных [309, 310], четыре домена образуют стержнеобразную форму длиной около 120 Å, что равно приблизительно сумме длин двух фрагментов D1D2 (65 Å) и D3D4 (60 Å). Конформация промежуточного участка из трех остатков (179–181) осталась экспериментально не установленной. У фрагмента D1D2 эти остатки являются С-концевыми и, обладая в кристалле, по-видимому, значительной подвижностью, не проявляются на картах электронной плотности. В предложенной модели CD4 (D1D2D3D4) N-концевые участки доменов D1 и D2 доступны для установления контактов с белками МНС класса II, а некоторые участки поверхностей доменов D3 и D4 имеют возможность взаимодействовать с белками Т-клеточного рецепторного комплекса собственного лимфоцита, впрочем структуры двух компонент пока неизвестны.

Структура антигена HLA-DR1 класса II. МНС-антигены человека носят название HLA (human leukocyte antigen), так как впервые были обнаружены на лейкоцитах. Аналогично МНС, антигены комплекса HLA делятся на два класса, I и II, представляющих собой набор гликопротеинов клеточной поверхности. При трансплантационных реакциях, как уже отмечалось, цитотоксические Т-клетки в основном

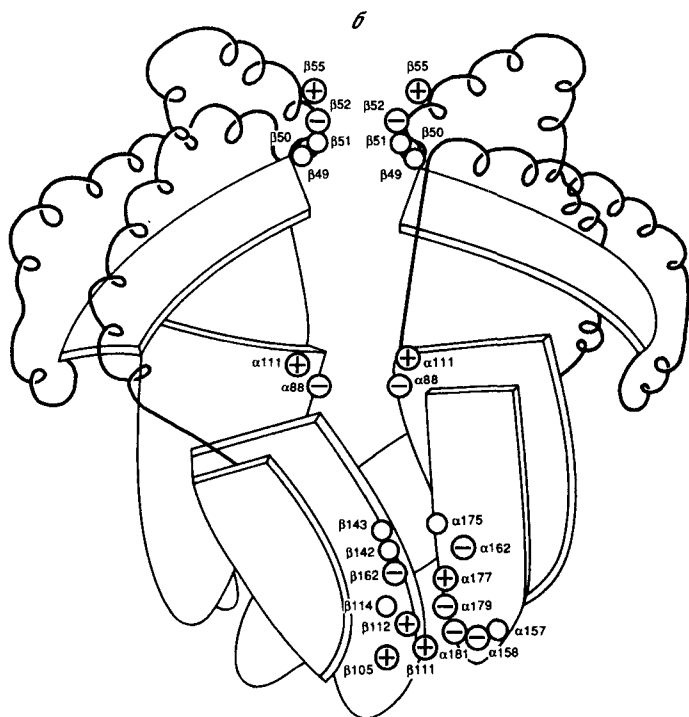
отвечают на чужеродные гликопротеины класса I, а Т-хелперы – на чужеродные гликопротеины класса II. Молекулы HLA класса II являются трансмембранными α , β -гетеродимерными белками молекулярной массы 60 кДа. Первоначально они экспрессируются специальными антигенпроизводящими клетками, такими как макрофаги, стромовые клетки и В-лимфоциты. Класс II HLA объединяет белки, превращающиеся из внеклеточных антигенов в хелперы Т-клеток в процессе идентификации чужеродных антигенов и иммунных ответов [311, 312]. У человека молекулы этого класса полиморфны и поэтому могут специфически взаимодействовать с наборами разных белков. Полиморфизм HLA, по-видимому, обуславливает отличающиеся иммунные ответы различных индивидуумов на действия одних и тех же чужеродных агентов; с ним же связаны разная восприимчивость к болезням, нарушение толерантности к собственным антигенам и возникновение аутоиммунных реакций [313, 314].

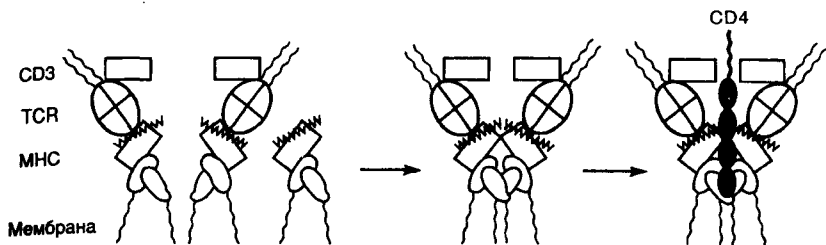
Кристаллы были выращены в водном растворе HLA-DR1 класса II, принадлежащего нескольким вариантам аллелей. Предварительно белок был очищен с помощью иммунноаффинной хроматографии и детергентов и освобожден от трансмембранной области и цитоплазматического домена действием папаина [315, 316]. Трехмерная структура внеклеточной части HLA-DR1 была определена с разрешением 3,3 Å путем комбинации данных рентгеновской дифракции, полученной от трех различных кристаллических образцов [316]. Во всех случаях белок кристаллизовался как димер DR1 α , β -гетеродимера. Найденная структура оказалась подобной молекулярной структуре HLA класса I [317] и отвечающей гипотетической модели пептидсвязывающего центра этого белка, сконструированного по кристаллографическим данным о пространственном строении HLA-A2 класса I [318]. Трехмерная структура мономерной единицы HLA-DR1 класса II в α , β -гетеродимере (рис. I.13, а) состоит из двух α -спиральных доменов α_1 и α_2 и двух β -структурных доменов β_1 и β_2 . Молекулу пересекает длинная пептидсвязывающая щель, дно которой выстлано восемью тяжами антипараллельного β -листа, а стенки – двумя антипараллельными спиральными участками. Между молекулами DR1 в димере имеются четыре контактных области (рис. I.13, б). Две из них расположены вблизи оси вращения второго порядка и включают взаимодействия остатков 49–55 (β_1) и 88, 111 (α_2). Другие две контактные области, наиболее удаленные от мембраны, образованы пятью парами аминокислотных остатков двух сближенных β_1 доменов. Кристаллографическая молекулярная структура DR1 [316] допускает образование комплекса с CD4, предположенного ранее на основе исследования мутагенных производных [319]. Если при Т-клеточном узнавании DR1 он находится в димерной форме, то, как свидетельствует рентгеноструктурный анализ белка, α_2 -домен второй молекулы димера может также контактировать с CD4, дополнительно усиливая взаимодействия DR1 с CD4.

Дж. Браун и соавт. [316] предложили гипотетический механизм сборки антиген-специфичного межклеточного комплекса HLA класса



Р и с. 1.13. Ленточная схема
трехмерной структуры α,β -
гетеродимера HLA—DR1
класса II (*a*) и области кон-
тактов субъединиц димера
(*b*) [316]



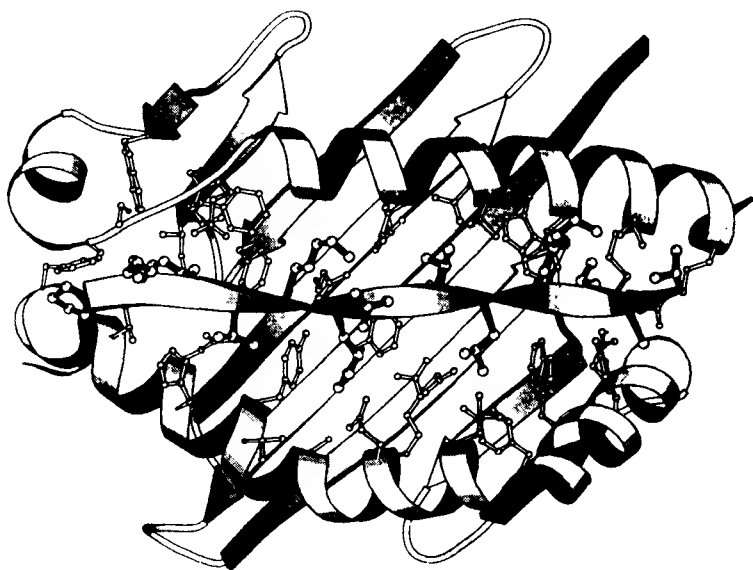


Р и с. I.14. Гипотетический механизм сборки антиген-специфичного клеточного комплекса HLA класса II, Т-клеточного рецептора и корецептора CD4 [316]

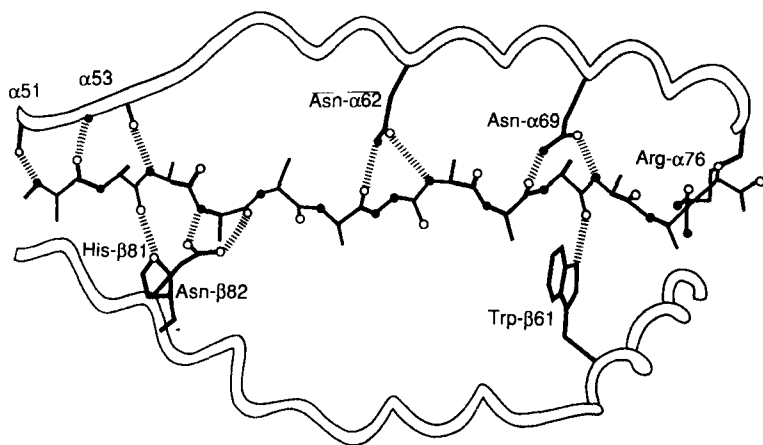
II, TCR и корецептора CD4 (рис. I.14). Предполагается, что на первых порах α , β -домены Т-клеточного рецептора и его ассоциированные CD3 и ξ -субъединицы образуют слабые димеры, подобные димерам DR1, которые до появления комплекса DR1–TCR не являются стабильными. Комплекс становится необратимым, как только молекулы DR1 связываются со специфическим пептидом посредством TCR. Окончательная стабилизация комплекса создает условия для возникновения эффективных взаимодействий четырехдоменного корецептора CD4 одновременно с обоими мономерами TCR и белками MHC II (рис. I.12, б). Ассоциация CD4 означает включение сигнальной системы для запуска иммунного клеточного ответа.

Структура комплекса HLA-DR1–пептид. Антигены главного комплекса гистосовместимости (MHC или у человека HLA) являются трансмембранными гликопротеинами. Они связывают пептиды внутри клетки, в цитоплазматическом пространстве, и доставляют их во внеклеточное пространство, где они становятся доступны Т-клеткам, участвующим в механизме функционирования иммунной системы, идентификации чужеродного антигена и для ответа на его появление [320, 321]. Взаимодействие Т-клеточного рецептора антигена с ассоциированным на MHC (HLA) пептидом стимулирует в Т-клетке экспрессию белков главного центра гистосовместимости. Индивидуальный организм имеет небольшой набор разновидностей таких белков. Между тем факты свидетельствуют о том, что каждый из них обладает способностью связывать огромное количество патогенных пептидов и сигнализировать о необходимости ответных действий. Кажущееся противоречие разрешается благодаря широкому полиморфизму молекул белков MHC, т.е. лабильности их трехмерных структур или, иными словами, возможности принимать отдельными, преимущественно поверхностными, участками белковой глобулы большое число самых разнообразных конформационных состояний.

Белки MHC класса I и класса II имеют различные организации доменов при сходном характере пространственных структур. Молекулы обоих классов обладают двумя, сближенными с мембраной, иммуноглобулиноподобными доменами и удаленным от мембраны пептидсвязывающим центром, образованным β -структурой из восьми тяжелей и двумя α -спиральными областями [316, 317]. Полиморфизм форми-



Р и с. I.15. Ленточная схема трехмерной структуры пептидсвязывающего центра HLA—DR1 класса II



Р и с. I.16. Схема водородных связей между пептидом и пептидсвязывающим центром комплекса HLA—DR1/HA

рующих связывающие центры аминокислотных остатков белков класса I и класса II обуславливает их легкую адаптируемость к пептидам различных последовательностей. Однако это не исключает специфичности взаимодействий. Белки МНС-I, как правило, ассоциируются с пептидами небольшой длины, обычно в 10 остатков, и отличаются

высокой избирательностью к природе аминокислот в определенных местах олигопептидной последовательности при толерантности к природе всех других участков цепи [322–324]. Белки МНС класса I функционируют в эндоплазматическом ретикулуме, где параллельно идет интенсивный процесс генерирующего пептиды протеолиза. Белки МНС класса II действуют в эндосомальных и липосомальных компартментах, в которых также одновременно идет протеолиз. Обычно представители этого класса связывают более длинные пептиды и также демонстрируют высокую чувствительность к локализации в последовательности различных аминокислот [325–328].

Результаты рентгеноструктурного анализа внеклеточных частей нескольких белков HLA-I человека [329–332] и МНС-I мыши [333, 334] свидетельствуют о наличии общего механизма пептидного связывания белками класса I. В структурах всех исследованных пептид-белковых комплексов пептиды имели сходные конформации, стабилизированные в центрах связывания в принципе одной и той же системой водородных связей и специфическими дисперсионными взаимодействиями боковых цепей нескольких остатков ассоциированного пептида с комплементарными им гидрофобными карманами белковой глобулы [332–338].

О связывании пептидов с белками МНС (HLA) класса II можно судить по результатам рентгеноструктурного исследования Л. Штерна и соавт. [338] пространственного строения комплекса внеклеточной части белка HLA-DR1 с пептидом вируса гриппа HA 306–318 тридекапептидным фрагментом гемагглютинина, мембранного гликопротеина этого вируса. Дифракционная картина получена от одного кристалла при -170° , используя синхронное излучение с $\lambda = 0,910 \text{ \AA}$. Трехмерная структура комплекса HLA-DR1/HA идентифицирована с разрешением $2,75 \text{ \AA}$. Ее ленточная диаграмма представлена на рис. 1.15. Тридекапептид HA сорбирован в связывающем центре HLA-DR1 в вытянутой, закрученной с большим шагом форме. Она представляет наилучшие возможности для взаимодействий, с одной стороны, с окружающими пептид аминокислотными остатками, а с другой - с поверхностными остатками T-клеточного рецептора. Таким образом, пептид открыт для межклеточных взаимодействий. Схема реализуемых в комплексе HLA-DR1/HA 12 водородных связей показана на рис. 1.16. Связи осуществляются только между атомами основной цепи пептида HA и атомами консервативных аминокислотных остатков α -спиральных и β -структурных областей HLA-DR1. Следовательно, система водородных связей не зависит от конкретной последовательности пептида, т.е. является универсальной для пептидных комплексов HLA-DR1 класса II. Этот факт свидетельствует также о близких ориентациях пептидов в комплексах одновременно связывающих центров белков HLA-DR1 и TCR, принадлежащих двум клеткам.

3.3. АСПАРТАТНЫЕ ПРОТЕИНАЗЫ

В разделах 3.1. и 3.2. были отмечены первые попытки подойти с помощью рентгеноструктурного анализа к решению проблемы структурной организации мембранных белков. Они завершились относительным успехом — установлением для ряда рецепторов трехмерных структур их периплазматических доменов, содержащих лиганд-связывающие центры. Развитие работ этого направления в конечном счете должно привести к определению пространственных структур целых рецепторных молекул, включающих также трансмембранные и цитоплазматические домены, и созданию экспериментальной основы, необходимой для решения проблемы структурнофункциональной организации молекул мембранных белков и количественного описания механизмов их функционирования. Трудности на этом пути, имеющие, главным образом, технический и препаративный характер, пока еще велики.

Настоящий раздел посвящен достижениям рентгеноструктурного анализа белков, знание пространственного строения которых представляет для человека поистине жизненный интерес. Речь пойдет об аспартатных протеиназах, прежде всего протеиназе вируса иммунодефицита человека (HIV) и ренине, одних из главных участников системы регуляции тонуса стенок кровеносных сосудов, скелетных мышц и других тканей. Ниже показано, что поиск радикальных терапевтических средств борьбы с синдромом приобретенного иммунодефицита (AIDS), другими видами вирусных заболеваний, гипертонией, т.е. решение сугубо прикладных задач экстраординарной важности, требует высокого уровня развития теоретической молекулярной биологии. Необходимой, хотя и не в полной мере достаточной, предпосылкой для его достижения является информация о трехмерных структурах соответствующих белковых молекул. В отличие от структурных исследований мембранных рецепторов, сдерживающим моментом здесь служат не трудности выделения, очистки и кристаллизации белков, а сложности более принципиального порядка.

Перед рассмотрением результатов рентгеноструктурного анализа молекул протеиназы HIV-1, принадлежащего к семейству РНК-содержащих вирусов *Retroviridae*, и ренина, протеолитического фермента млекопитающих, которые в последние годы привлекли к себе исключительное внимание как перспективные терапевтические мишени, несколько слов об общем состоянии исследований аспартатных протеиназ. Молекулы аспартатных (карбоксильных) протеиназ вместе с сериновыми, цистеиновыми и металлопротеиназами образуют группу эндопептидаз, входящих в состав амидгидролаз. Они обнаруживаются у животных (пепсин, катепсин, химозин, ренин и др.), в микроорганизмах (пенициллопепсин, эндотиапепсин, ризопуспепсин и др.) и ретровирусах (протеиназы вирусов иммунодефицита человека и обезьяны, саркомы Роуза и др.). Аминокислотные последовательности известных ферментов этой группы обладают гомологией, особенно заметной в областях активных центров, что указывает на их эволюционное родство.

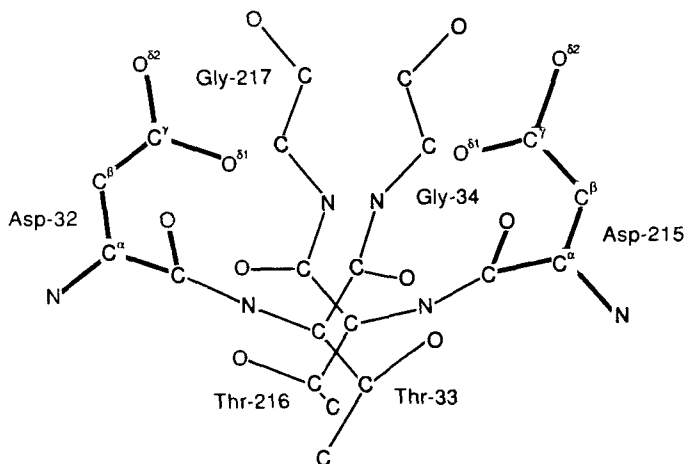
Первые кристаллографические структуры аспартатных протеиназ стали известны в 1977 г., когда были опубликованы данные рентгеноструктурного анализа пространственного строения молекул сразу четырех ферментов: пепсина, пенициллопепсина, эндотиопепсина и ризопуспепсина (табл. I.1). Структуры были идентифицированы с разрешением 2,5—3,0 Å. Прошло около десяти лет, пока разрешение удалось довести до 1,8—2,1 Å, которое уже с достаточной надежностью позволило судить о деталях строения самих ферментов и взаимодействующих с ними молекул ингибиторов и воды. За это время были расшифрованы структуры еще двух аспартатных протеиназ — химозина и ренина, а также структуры ряда ингибиторных комплексов четырех упомянутых выше ферментов. Кристаллографический анализ показал, что, несмотря на существенное различие в последовательностях аминокислот, пространственное строение молекул аспартатных протеиназ животных и микроорганизмов сходно. Все они построены из двух симметрично расположенных и почти целиком состоящих из β -структур доменов. Оба домена воспроизводят одинаковый структурный мотив и содержат попадающие в активный центр фермента участки Asp—Thr—Gly. В контактной области домены образуют щель, пересекающую большую часть глобулы белка. В центре щели находятся два каталитически важных остатка Asp-32 и Asp-215 (нумерация пепсина), карбоксильные группы которых сближены друг с другом и с несколькими другими остатками, а также с молекулами кристаллизационной воды. Система стабилизирована сетью водородных связей, электростатическими и дисперсионными взаимодействиями (рис. I.17). Исследования трехмерных структур комплексов аспартатных протеиназ с субстратоподобными ингибиторами (табл. I.1) позволили идентифицировать для каждого фермента места активного центра и соотнести их с участками субстрата, ответственными за первичную и вторичную специфичность ферментативной реакции. Составление структур нативных протеиназ с их ингибиторными комплексами показало, что связывание олигопептидных лигандов, значительно отличающихся от субстратов, сопровождается поворотом одного домена относительно другого приблизительно на 4° и его смещением на $\sim 0,3$ Å вдоль оси, проходящей через C^α -атомы остатков Asp-32 и Asp-215. Изменение во взаимной ориентации доменов приводит к уплотнению щели и заметной деформации активного центра — увеличению расстояния между некоторыми остатками на $\sim 2,0$ Å и смещению боковых цепей до 3,5 Å. Было предположено, что такие изменения необходимы для протекания ферментативной реакции и, следовательно, происходят также при образовании фермент-субстратных комплексов [377].

Представление о чисто химических аспектах ферментативных реакций аспартатных протеиназ сформировалось еще до становления кристаллографии белков. Детальные исследования неферментативного гидролиза разнообразных эфиров, амидов и модельных пептидов, проведенные главным образом в 1960-е годы, показали, что катализ оказывается эффективным лишь в среде, включающей следующие три

Фермент	Ингибитор	Разрешение, Å	Литература
Пепсин	— HPhе(12) TyrOMe	2,7; 2,3; 2,0; 1,8 3,0	[339—343] [344]
Пепсиноген	—	1,8	[345, 346]
Химозин	—	2,3	[347—349]
Ренин	— His—Pro—Phe—His—Leu—Leu—Tyr—Tyr—Ser	2,5; 2,8 2,5; 2,4; 2,6; 2,0	[350, 351] [351—354]
Пенициллопепсин	— Iva—Val—Val—Lysta—OEt	2,8; 1,8 2,6; 1,8	[355—357] [358, 359]
Эндотиопепсин	— Pro—Thr—Glu—Phe—CH ₂ NH—Phe—Arg—Glu Boc—Thr—His—NH—CH—CH(OH)NCO—Lys—Phe CH₂Ph CH₂CHMe₂ Boc—His—Pro—Phe—His—Sta—Leu—Phe—NH ₂	3,0; 2,4; 2,1 2,0 1,8 2,2	[360—362] [363] [364] [365]

Т а б л и ц а 1.1 (окончание)

Фермент	Ингибитор	Разрешение, Å	Литература
Ризопупспепсин	—	2,5; 1,8	[360, 366, 367]
	Ac—CO—Val—Sta—Ala—StaOH	2,5	[368]
	D-His—Pro—Pro—Phe—His—Phe—Ψ[CH ₂ NH]Phe—Val—Tyr	1,8	[369]
Протеиназа вируса птичьего миелобластога (BMV)	—	2,4	[370]
Протеиназа вируса саркомы Роуза (RSV)	—	2,0	[371]
Протеиназа вируса иммуно- дефицита человека (HIV-1)	—	3,0; 2,8	[372, 373]
	H—Val—Ser—Gln—Asn—Leu—Ψ[CH(OH)CH ₂] (U-85548e)—Val—Ile—Val—OH	2,5	[374]
	Ac—Ser—Leu—Asn—Phe—Ψ[CH(OH)CH ₂] (JG-365)—Pro—Ile—Val—OMe	2,4	[375]
	Ac—Thr—Ile—Nle—CH ₂ Nle—Gln—Arg—NHMe (MVT-101)	2,3	[376]



Р и с. I.17. Каталитически важные остатки активного центра аспартатных протеиназ

компонента: нуклеофил, атакующий карбонильный углерод расщепляемой пептидной связи, основной катализатор, способствующий отщеплению протонов от нуклеофила, и кислотный катализатор, обеспечивающий протонизацию уходящей группы [378]. Эти же исследования, а также изучение кинетики и термодинамики ферментативных реакций протеиназ позволили прийти к еще одному выводу общего характера — химические механизмы действия всех протеолитических ферментов могут быть сведены к двум типам: ковалентному катализу и общему основному катализу. В первом случае инициирующим ферментативную реакцию компонентом является нуклеофил белковой молекулы, непосредственно взаимодействующий с субстратом и образующий с ним промежуточные ковалентные соединения. В реакциях протеолитического гидролиза второго типа фермент по ходу всего каталитического акта не образует ковалентных соединений с субстратом. Его нуклеофильная атомная группировка выступает в этом случае как основной катализатор, который, взаимодействуя с молекулой воды, депротонирует ее и превращает в эффективный нуклеофил, непосредственно атакующий карбонильный углерод расщепляемой пептидной связи.

Использование В.К. Антоновым и соавт. метода, основанного на включении атома тяжелого кислорода молекулы H_2^{18}O в продукты ферментативных реакций, сыграло, по-видимому, решающую роль в установлении типа каталитической реакции аспартатных протеиназ [378—380]. Проведенные впервые В.К. Антоновым сопоставительные исследования гидролиза, катализируемого различными амидгидролазами, показали, что сериновые и цистеиновые протеиназы функционируют по ковалентному типу, а аспартатные и металлсодержащие протеиназы — по типу общего основного катализа. Этот вывод согласуется с наиболее однозначно трактуемыми результатами химических, кинетических и термодинамических исследований каталитических реакций эндопро-

теиназ. Он был подтвержден позднее данными рентгеноструктурного анализа ферментов, и в настоящее время является общепризнанным.

Структура аспартатной протеиназы HIV-1. Интерес к механизму действия аспартатных протеиназ особенно возрос в последнее время в связи с обнаружением ферментов этой группы у ретровирусов, вызывающих в организмах человека и животных такие болезни, как AIDS, некоторые виды лейкозов, сарком и онкоопухолей молочных желез. Самое важное здесь заключается в установлении того факта, что ставшие известными аспартатные протеиназы этих вирусов играют ключевую роль в их жизненных циклах. В клетке-хозяине они гидролизуют белки ядерных капсид, окружающих вирусные РНК, расщепляя полибелковые цепи на зрелые структурные белки и ферменты, участвующие в репликации ретровирусов. Вирусные протеиназы в состоянии также гидролизовать белки инфицированных клеток, нарушая тем самым целостность их структурно-функциональной организации. В то же время клеточные протеолитические ферменты не обладают способностью расщеплять вирусные протеиназы и выполнять их функции. Таким образом, в отсутствие протеиназ или при их ингибировании вирусы иммунодефицита человека (HIV-1, HIV-2) и обезьяны (SIV), а также опухолеродные вирусы не смогли бы приобретать инфекционные формы. По этой причине протеиназы ретровирусов стали объектами пристального внимания энзимологов и медиков.

Аспартатные протеиназы ретровирусов сразу же после их открытия начали интенсивно исследоваться и через 2—3 года стали одними из наиболее тщательно изученных ферментов. Основное внимание было уделено аспартатной протеиназе HIV-1, о структуре и функции которой сейчас известно, пожалуй, больше, чем о таком классическом объекте, как пепсин, открытом еще в 1836 г. Последовательность HIV-1 протеиназы состоит из 99 аминокислотных остатков, тогда как аспартатные протеиназы позвоночных и микроорганизмов содержат их более трехсот. В ней встречается фрагмент Asp—Thr—Gly, присутствующий в каждом домене у всех пепсиноподобных ферментов. Л. Пёрл и У. Тейлор предположили, что физиологически активная форма HIV-1 протеиназы включает две молекулы, ассоциированные посредством невалентных взаимодействий [381]. Я. Чанг и соавт. проверили это предположение экспериментально [382]. Методами генной инженерии была синтезирована полипептидная цепь из 203 аминокислотных остатков, составляющих две молекулы HIV-1 протеиназы, C- и N-концы которых соединены пентапептидным участком Gly—Gly—Ser—Ser—Gly. Такой валентно связанный димер в физиологических условиях спонтанно принимал конформацию нативного димера и обладал идентичной с ним активностью. Этот вывод недавно нашел подтверждение в работе Т. Бхата и соавт., определивших трехмерную структуру аналогичным образом связанного димера протеиназы HIV-1 с разрешением 1,8 Å [383]. При замене одного из двух каталитически важных остатков Asp-25 на Gly активность пропадает. К тем же результатам привело исследование

Т а б л и ц а 1.2

Расстояния (Å) между атомами боковых цепей Asp-32 и Asp-215 (нумерация пепсина) в кристаллографических структурах аспартатных протеиназ

Фермент	$O_{32}^{\delta 1}-O_{215}^{\delta 1}$	$O_{32}^{\delta 2}-O_{215}^{\delta 2}$	$C_{32}^{\gamma}-C_{215}^{\gamma}$	$O_{32}^{\delta 1}-O_{215}^{\delta 2}$
Пепсин	2,8	5,8	5,1	4,4
Ренин	2,9	6,2	5,3	4,8
Пенициллопепсин	2,9	5,8	5,2	4,4
Эндотиопепсин	2,9	5,7	5,2	4,4
Ризопуспепсин	3,1	6,1	5,4	4,7
HIV-1 протеиназа	3,0	5,8	5,2	4,7
RVS-протеиназа	2,8	5,6	5,0	4,6

Фермент	$O_{32}^{\delta 2}-O_{215}^{\delta 1}$	$C_{32}^{\beta}-C_{215}^{\beta}$	$C_{32}^{\alpha}-C_{215}^{\alpha}$
Пепсин	4,8	7,4	6,7
Ренин	4,8	7,4	6,6
Пенициллопепсин	4,8	7,5	6,6
Эндотиопепсин	4,8	7,6	6,6
Ризопуспепсин	5,0	7,7	6,8
HIV-1 протеиназа	4,7	7,4	6,6
RVS-протеиназа	4,2	7,4	6,4

К. Диланни и соавт. валентно связанного димера HIV-1 протеиназы с дипептидным мостиком Gly—Gly и заменой Asp-25 на Asn и Glu [384].

А. Томасселли и соавт. определили константу диссоциации нативного димера HIV-1 протеиназы, которая оказалась равной 2 пМ [385]. Согласно Я. Чангу и соавт., ее величина составляет 50 пМ [382]. Несмотря на значительное расхождение найденных констант диссоциации, можно тем не менее полагать, что димеризация HIV-1 протеиназы происходит в нанолярной области, т.е. при концентрации много ниже той, которая существует в вирусной частице. Исследование С. Силмейера и соавт. показало, что каталитическая активность HIV-1 протеиназы подавляется пепстатиновыми ингибиторами, что характерно для всех аспартатных протеиназ [386]. Там же отмечено, что замена в последовательности вирусной протеиназы остатка Asp-25 на Thr ведет к полной потере активности. Аналогичный эффект наблюдался при замене в последовательности HIV-1 протеиназы остатка Asp-25 на Asn [386, 387], Ala [388, 389], Tyr и His [388]. Активность падает до нуля также у пепсина в случае подобного мутагенеза одного из его каталитических остатков Asp [390]. Таким образом, можно утверждать, что физиологически активной является димерная форма HIV-1 протеиназы, в которой каталитически важную роль играют оба остатка аспарагиновой кислоты (Asp-25 и Asp-125). Лишь эта форма обладает всеми отличительными признаками аспартатных протеиназ. Следовательно, димерная форма HIV-1 протеиназы, подобно пепсину, ренину, ризопус-

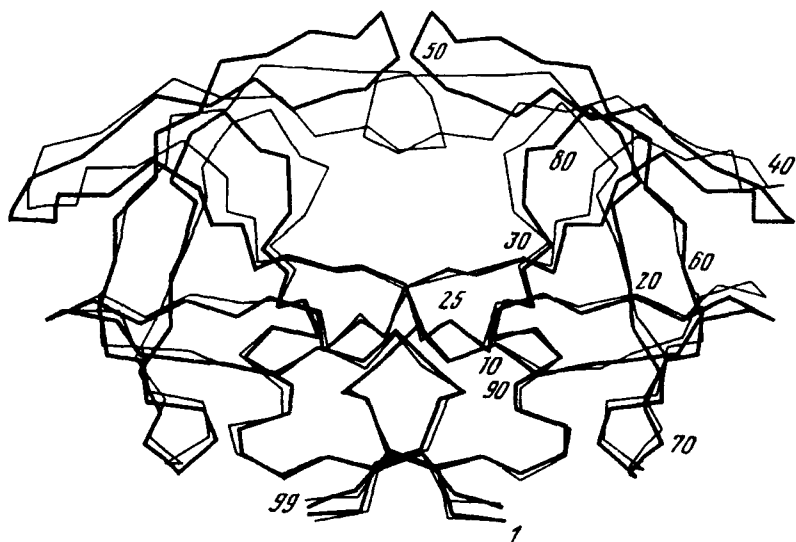
пепсину и другим ферментам данной группы, должна функционировать по типу общего основного катализа. В какой мере вывод о едином химическом механизме каталитических реакций аспартатных протеиназ подтверждается данными рентгеноструктурного анализа ретровирусных протеолитических ферментов?

В настоящее время известны трехмерные структуры трех аспартатных протеиназ ретровирусов: HIV-1, RSV, BMV и трех комплексов HIV-1 протеиназы с субстратоподобными ингибиторами U-85548e, JG-365 и MVT-101 (табл. I.1). Все они являются димерами, структурно родственными друг другу и аспартатным протеиназам из других источников. Более того, можно считать, что все известные протеиназы имеют совпадающие по геометрии активные центры (подразумевается непосредственное место сорбции расщепляемой пептидной группировки). На это указывает количественная близость (практически совпадение) в молекулах ферментов расстояний между соответствующими атомами двух функциональных остатков аспарагиновой кислоты (табл. I.2). Таким образом, следует заключить, что ферментативные реакции аспартатных протеиназ позвоночных, микроорганизмов и ретровирусов имеют одинаковые стартовые условия и, следовательно, должны протекать по одному и тому же, а именно основному, типу катализа.

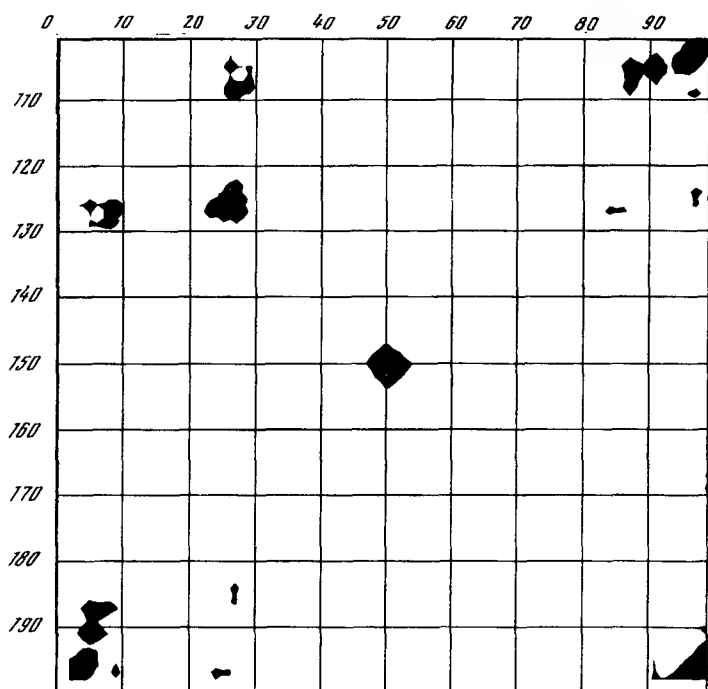
На рис. I.18 сопоставлены кристаллографические структуры нативной молекулы HIV-1 протеиназы и ее ингибиторного комплекса, а на рис. I.19 приведена карта расстояний между атомами C α (до 10 Å) двух ассоциированных молекул протеиназы. Наибольший вклад в стабилизацию димера вносят невалентные контакты двух пар N-концевых (1—8, 101—108) и C-концевых (87—99, 187—199) фрагментов, образующих между собой многочисленные и разнообразные по своей природе контакты (дисперсионные, электростатические и посредством водородных связей). Укладка в процессе димеризации этой плотноупакованной и, по-видимому, наиболее стабильной части HIV-1 протеиназы оказывает значительное и непосредственное влияние на формирование близкорасположенного активного центра. Взаимодействия более 40 аминокислотных остатков четырех концевых фрагментов весьма избирательны. На это указывает, например, отсутствие каталитической активности у димерного комплекса, составленного из смешанных цепей вирусов HIV-1 и HIV-2, имеющих близкую гомологию [385]. Для потери активности оказалось достаточно трех замен в положениях 6, 92 и 95, поскольку на всех других участках, контактирующих в димере, последовательности ферментов двух вирусов совпадают.

В димерном комплексе HIV-1 протеиназы сближены также фрагменты 23—28 и 123—128, которые включают эффективно взаимодействующие между собой трипептидные фрагменты Asp-25—Thr-26—Gly-27 и Asp-125—Thr-126—Gly-127 — непереносимые участники активных центров всех аспартатных протеиназ. Эта контактная область двух молекул дополнительно стабилизируется невалентными взаимодействиями с остатками 7—9, 107—109 и 84—85, 184—185 соответственно N- и C-концевых фрагментов.

Наконец, есть еще одна область межмолекулярных взаимодействий



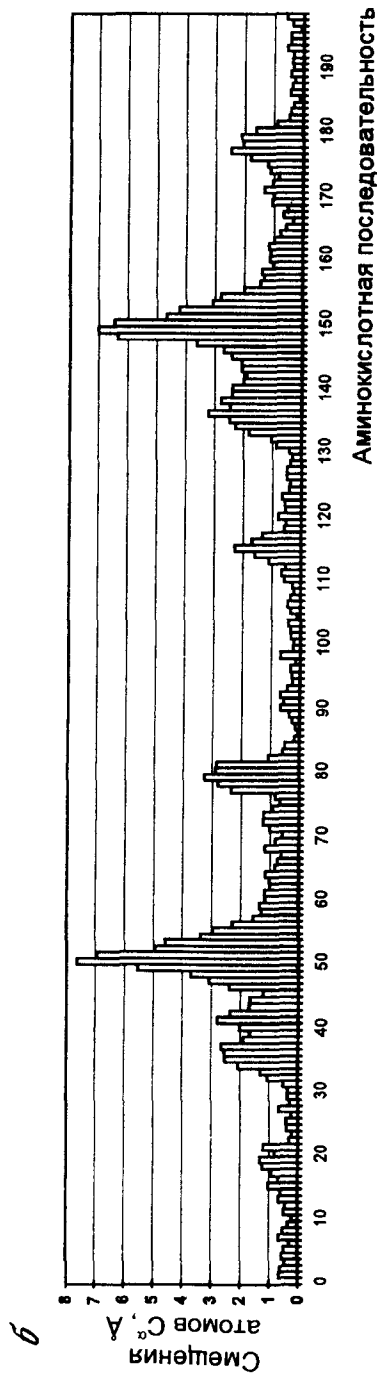
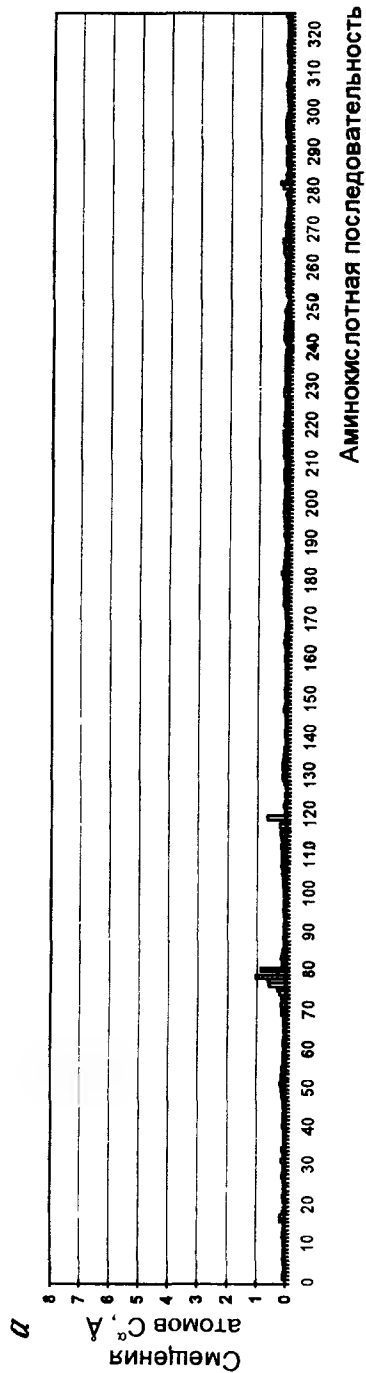
Р и с. I.18. Основные цепи нативной HIV-1 протеиназы (жирная линия) и ее комплекса с ингибитором JG-365 (тонкая линия)



Р и с. I.19. Карта расстояний между атомами C^α молекул HIV-1 протеиназы в димере (темные области соответствуют расстояниям $< 10 \text{ \AA}$)

димерной HIV-1 протеиназы. Ее составляют два β -складчатых листа, 45—57 и 145—157, нависающих подобно распластанным крыльям над активным центром и получивших название "флепов" (flap). В нативном состоянии ферментов они не участвуют в стабилизации димерной формы и удерживают свое положение взаимодействиями сближенных по отношению друг к другу пентапептидных участков 48—52 и 148—152 (рис. I.18, I.19), а также, по-видимому, за счет контактов с соседним в кристаллической решетке димером. Важную роль флэпы играют на стадии образования невалентного комплекса. В процессе фермент-субстратных (ингибиторных) взаимодействий происходит огромная, не имеющая прецедентов в каталитических реакциях других ферментов (во всяком случае, протеолитических) конформационная перестройка значительной части нативной структуры. Она затрагивает не только боковые цепи остатков активного центра, что обычно имеет место, но и основные цепи обеих молекул HIV-1 протеиназы. Наибольшие изменения при комплексообразовании претерпевают как раз участки 45—57 и 145—157. Если судить по смещениям атомов C^α , то они составляют около 8,0 Å у центральных остатков 50, 51 и 150, 151, постепенно затухая до 1,0 Å у концевых остатков β -структур 45, 57 и 145, 157 (рис. I.20). Встречные концы флэпов смещаются к сорбированной в активном центре молекуле субстрата (ингибитора). Заметные перемещения (2,0—3,0 Å), также уменьшающие размеры полости активного центра, синхронно совершают фрагменты 77—81 и 177—181. Смещения атомов C^α у двух молекул HIV-1 протеиназы в димерном комплексе близки, хотя и не идентичны. Изменения в положениях флэпов при образовании комплексов наблюдаются и у других аспартатных протеиназ. Однако, как видно из рис. I.20, на котором показаны смещения атомов C^α в фермент-ингибиторном комплексе ризопусспесина, различия здесь менее значительны. Что же касается других участков основной цепи белка, то они практически не реагируют на ассоциацию с ингибитором.

Большой интерес, прежде всего при поиске антивирусных лекарственных препаратов, представляет знание процесса димеризации HIV-1 протеиназы. Особого внимания здесь заслуживает вопрос о том, происходит ли ассоциация молекул без изменения их пространственного строения, или этот процесс сопровождается конформационной адаптацией партнеров. Если изменения имеют место, то открывается возможность воспрепятствовать образованию активного комплекса путем такого целенаправленного воздействия на молекулы фермента, которое сделало бы невозможным конформационные перестройки, необходимые для их объединения. Быть может, такое направление развития антивирусной терапии окажется наиболее перспективным в силу исключительности механизма образования активных форм ретровирусных протеиназ по сравнению с аспартатными протеиназами из других источников. Однако непосредственно наблюдать трехмерную структуру отдельной молекулы HIV-1 протеиназы, чтобы сопоставить ее со структурой субъединицы в димерном комплексе, не представляется возможным, поскольку фермент кристаллизуется лишь в форме димера. Поэтому для решения



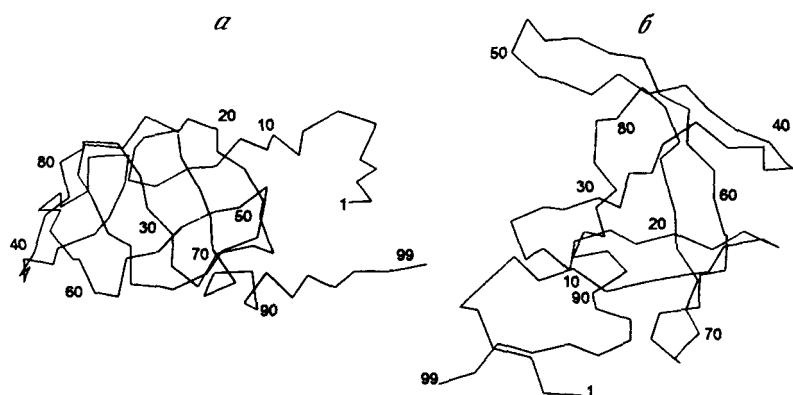
Р и с. 1.20. Смещения атомов C^{α} в молекулах димерной HIV-1 протеиназы при образовании невалентного комплекса с ингибитором JG-365 (а) и в молекуле ризопустепсина при образовании невалентного комплекса с ингибитором (б)

задачи остается теоретический путь — априорный расчет конформации свободной молекулы HIV-12 протеиназы по известной аминокислотной последовательности.

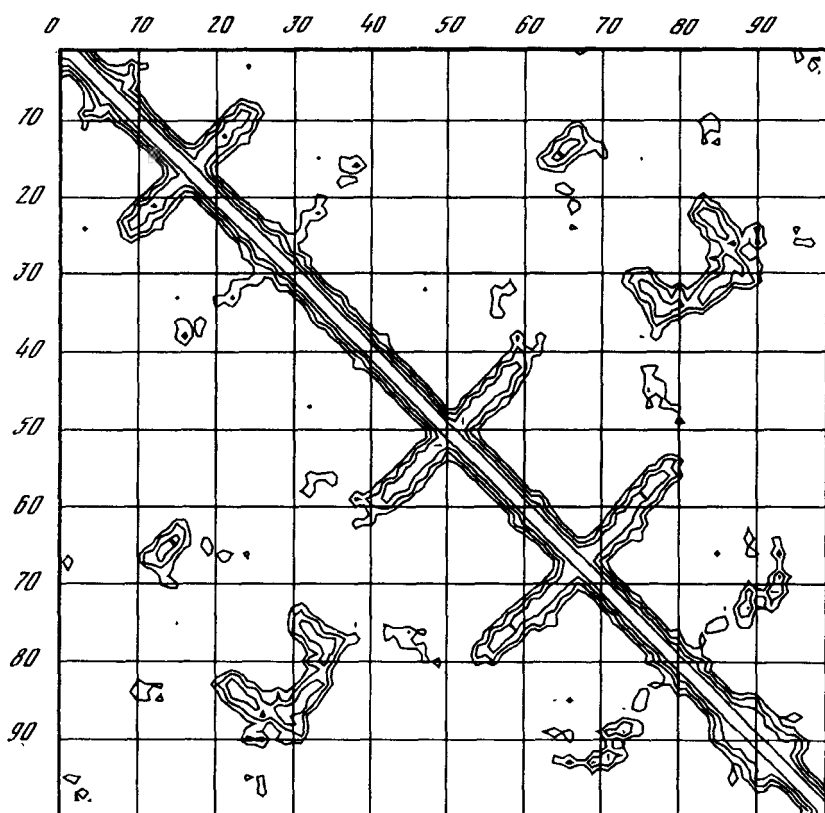
На рис. I.21 приведены проекции пространственной структуры одной из субъединиц в нативном димерном ассоциате, на рис. I.22 — расстояния между атомами C^α аминокислотных остатков той же структуры (так называемая карта Кунтца, дающая представление о сближенности остатков в конформации белковой молекулы). Из рис. I.21 и I.22 видно, что первые девять N-концевых и последние шесть C-концевых остатков последовательности не взаимодействуют друг с другом и с остальной частью молекулы из-за своей удаленности. Развернутые конформационные состояния этих фрагментов наиболее благоприятны для межмолекулярных взаимодействий, которые они осуществляют в структуре каталитически активного димера HIV-1 протеиназы (рис. I.18 и I.19). Выше отмечалось, что именно межмолекулярные контакты четырех концевых групп двух последовательностей вносят основной вклад в стабилизацию димера. В то же время развернутые формы участков 1—9 и 94—99 энергетически невыгодны для свободных молекул фермента, и их реализация в разбавленном растворе маловероятна. Следовательно, в процессе димеризации должен происходить конформационный переход от свернутых форм, выгодных для свободных молекул, к развернутым, предпочтительным для ассоциированных. Из рис. I.21 и I.22 столь же очевидно, что одновременно должно изменяться также конформационное состояние флепа 45—57, которое в комплексе определяется взаимодействиями с флепом второй молекулы и, возможно, с димером смежной элементарной ячейки.

Из только что сказанного очевиден возможный путь поиска терапевтических средств защиты здоровья человека от ретровирусов, в частности, вируса иммунодефицита человека — создание препаратов, препятствующих димеризации молекул аспартатных протеиназ. Без этого невозможно функционирование фермента, а следовательно, и реализация жизненного цикла вируса.

Другой подход к получению необходимых лекарств связан с созданием особых ингибиторов ретровирусных аспартатных протеиназ. Среди требований, предъявляемых к свойствам ингибиторов, главное и самое трудновыполнимое касается избирательности их действия. Ингибиторы, обладающие терапевтическим эффектом, должны быть, прежде всего, специфичными до такой степени, чтобы, дезактивируя ретровирусную протеиназу, не нарушать нормального функционирования как аспартатных, так и других протеолитических ферментов клетки-хозяина. Для целенаправленного поиска ингибиторов, удовлетворяющих этому требованию, необходимо располагать количественными данными о всех стадиях каталитического акта вирусной протеиназы, аналогичными сведениями о механизмах функционирования протеиназ инфицированной клетки и методом решения обратной структурной задачи, т.е. конструирования химического строения ингибитора по наперед заданной пространственной форме. В связи с проблемой специфичности фермент-субстратных взаимодействий особое значение



Р и с. 1.21. Проекции (а, б) конформации молекулы HIV-1 протеиназы в димере

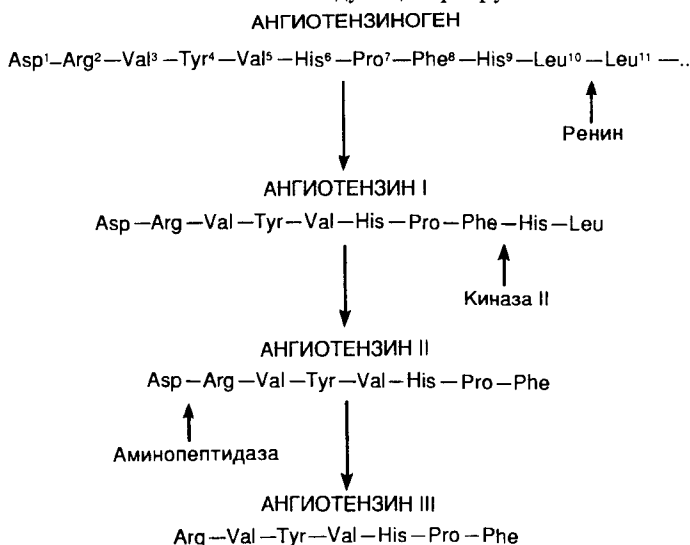


Р и с. 1.22. Расстояния между атомами C^α в молекуле нативной HIV-1 протеиназы (карта Кунгца)

Контурные линии отвечают одинаковым расстояниям между атомами C^α в 4, 6, 8 и 10 Å

имеют данные, прежде всего рентгеноструктурные, о ренине, аспаратной протеиназе плазмы крови. Дело в том, что этот фермент в отличие от других аспаратных протеиназ, да и вообще амидгидролаз, обладает практически абсолютной специфичностью. Известно, что ренин гидролизует лишь свой природный субстрат — ангиотензиноген, отщепляя от его N-концевой части декапептид, и небольшое число синтетических аналогов высокой гомологии N-концевой последовательности ангиотензина [378]. Почти любая аминокислотная замена в субстрате на пентапептидном фрагменте до расщепляемой связи (P_5-P_1) и на тетрапептидном участке после нее ($P'_1-P'_4$) ведет к непродуктивному комплексу Михаэлиса и отсутствию гидролиза. Причина такой феноменальной специфичности ренина пока остается невыясненной.

Структура ренина и его ингибиторных комплексов. Ренин — гликозилированный белок, входит в ферментную систему, осуществляющую биогенез и распад октапептидного тканевого гормона ангиотензина II, самого мощного из известных прессорных агентов в системе кровообращения. Ангиотензин II стимулирует сужение периферических артериол по всему организму и тем самым повышает артериальное давление. Помимо этого, он активирует секрецию ряда гормонов (главным образом, альдостерона), влияет на работу сердца, печени, центрального и периферического отделов нервной системы, а также вызывает ряд других откликов в организме млекопитающих. Его непосредственный предшественник — ангиотензин I, образуется из уже упоминавшегося глобулярного белка крови ангиотензиногена путем отщепления от него под действием ренина N-концевого декапептида. Согласно приведенной ниже схеме, гидролиз пептидной связи между остатками Leu-10 и Leu-11 является первой и скорость-определяющей стадией в каскаде ферментативных реакций превращения ангиотензиногена в ангиотензин II с его последующим разрушением.



Пространственное строение ренина исследовалось в ряде работ. А. Силецки и соавт. идентифицировали трехмерную структуру частично дегликозилированного нативного рекомбинантного ренина человека с разрешением 2,5 Å [350]. Ряд пептидных участков на периферии глобулы не просматривался на картах электронной плотности, и поэтому они были отнесены к конформационно лабильным, лишенным детерминированных структур петлям. Позднее Дж. Рауэл и соавт. выполнили рентгеноструктурный анализ гликозилированного нативного ренина человека и его ингибиторных комплексов с разрешением соответственно 2,8 и 2,4 Å [351]. Структура фермент-ингибиторного комплекса этого белка была определена также В. Дханарасем и соавт. с разрешением 2,6 Å [354]. В отмеченных работах описаны стабилизирующие взаимодействия специфических карманов активного центра фермента с боковыми цепями остатков P_4 — P'_4 на октапептидном участке ингибиторов.

Наиболее детально и с лучшим разрешением (2,0 Å) изучена К. Дилвисом и соавт. [391] кристаллическая структура субмаксиллярного ренина мыши, ингибированного субстратоподобным декапептидом CH-66: Piv—His—Pro—Phe—His—Leu(ψ)—CH(OH)—CH₂—Leu—Tyr—Tyr—Ser—NH₂(P_6 — P_5 — P_4 — P_3 — P_2 — P_1 — P'_1 — P'_2 — P'_3 — P'_4), где Piv — пивалоильная блокирующая группа, а —CH(OH)—CH₂ — гидроксипропиловая группа с S-конфигурацией второго асимметрического атома C Leu(ψ). Были определены положения 10038 атомов 325 аминокислотных остатков гликозилированного фермента, 364 атомов ингибитора и 613 атомов кислорода кристаллизационной воды. Среднеквадратичная ошибка в координатах атомов составила 0,21 Å, а среднеквадратичные отклонения от стандартных значений длин связей — 0,026 Å и угловых расстояний — 0,054 Å. Трехмерные структуры исследованных ренинов наделены теми же характерными особенностями, что и другие аспартатные протеиназы. Они также являются β -структурными белками, состоящими из двух доменов. Между ними находится субстрат связывающая щель, в центре которой размещены каталитически важные остатки Asp-32 и Asp-215, а за ними, как и у других ферментов этой группы, следуют Thr и Gly. Очень близки пространственные структуры молекул ренина из разных источников. Например, различие в ориентациях доменов в структурах ренина мыши и человека не превышает 1,7°. Положение доменов у пепсина по сравнению с ренином мыши отличается на 6,9°, а у эндотиопепсина — 18,8°.

Декапептидный лиганд в фермент-ингибиторном комплексе имеет конформацию β -сложенного листа, вытянутого вдоль субстрат-связывающей щели (табл. I.3 [373—379, 391]). Его карбоксипропиловая группа между двумя остатками Leu занимает в активном центре фермента положение чувствительного места субстрата и образует водородные связи с карбоксильными группами каталитических остатков Asp-32 и Asp-215. Конформационные состояния основных и боковых цепей всех остатков ингибитора в комплексе с ренином отвечают наиболее низкоэнергетическим формам свободных аминокислот, и в то

Двууглеродные углы вращения φ , ψ , ω (град) основной цепи ингибитора СН-66 в активном центре реннина и ингибиторов U-85548e, JG-365 и MVT-101 в активном центре протеиназы HIV-1

Положение остатков	Ренин				Протеиназа HIV-1											
	Остатки	СН-66			Остатки	U-85548e			Остатки	JG-365			Остатки	MVT-101		
		φ	ψ	ω		φ	ψ	ω		φ	ψ	ω		φ	ψ	ω
P ₅	His	-76	114	-170	Val	—	11	175	—	—	—	—	—	—	—	—
P ₄	Pro	-81	147	-175	Ser	-106	126	178	Ser	-64	169	180	—	—	125	-176
P ₃	Phe	-103	123	180	Gln	-108	148	-177	Leu	-123	138	178	Thr	—	92	-178
P ₂	His	-111	92	-178	Asn	-138	101	-178	Asn	-143	104	180	Ile	-121	92	-178
P ₁	Leu (Ψ)	-101	44*	167*	Leu (Ψ)	-97	63*	133*	Phe (Ψ)	-94	47*	151*	Nle (Ψ)	-92	72*	142*
P ₁ '	Leu	-89*	130	177	Val	-56*	150	173	Pro	-57*	174	175	Nle	-92*	154	-179
P ₂	Tyr	-75	133	174	Ile	-139	124	177	Ile	-130	122	-177	Gln	-151	123	178
P ₃	Tyr	-130	145	-174	Val	-126	157	—	Val	-143	138	—	Arg	-81	129	—
P'	Ser	-85	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

*Значения углов отвечают нестандартным участкам P₁—P₁' ингибиторной цепи.

*Значения углов отвечают нестандартным участкам P₁—P₁' ингибиторной цепи.

**Остатки ренина, атомы которых образуют близкие контакты с атомами ингибитора
СН-66 ($< 4,2 \text{ \AA}$) [391]**

Субстратсвязывающие карманы	Остатки ренина, образующие субстратсвязывающие карманы
S ₆	Leu-10, Ser-12, Phe-220, Leu-276, W7, W8, W138
S ₅	Ser-12, Pro-111, Leu-114, Ser-219, W7, W8
S ₄	Ser-219, Phe-220, His-287, W77, W138, W147
S ₃	Gln-13, Ser-77, Pro-111, Leu-114, Ala-115, Phe-117, Gly-217, Ser-218, Ser-219, W7, W11, W77
S ₂	Tyr-75, Gly-76, Ser-77, Ser-218, Ser-222, His-287, Met-289, Val-300, W77, W147
S ₁	Asp-32, Gly-34, Tyr-75, Phe-117, Val-120, Asp-215, Gly-217
S ₁	Gly-34, Ile-73, His-74, Tyr-75, Gly-76, Glu-128, Val-130, Val-213, Asp-215, Ile-291, Val-298, Val-300, W76, W87
S ₂	Gly-34, Ser-35, Ile-73, His-74, Tyr-75, Glu-128, Val-130, Ile-291, Thr-295, W28, W73, W74, W76
S ₃	His-74, Tyr-75, Gly-76, Ile-291, Pro-292, Thr-295, W74, W75
S ₄	Pro-294, Thr-295, W75

же время, являясь развернутыми структурами, предоставляют наилучшие условия для эффективных взаимодействий с остатками активного центра фермента. В табл. 1.3 приведены значения двухгранных углов ϕ , ψ и ω , определяющих геометрию основной цепи ингибитора ренина (СН-66) [391] и трех ингибиторов аспартатной протеиназы HIV-1 (U-85548e, JG-365, MVT-101) [374—376]. Из сопоставления следует, что совершенно разные ингибиторы при ассоциации с активными центрами аспартатных протеиназ млекопитающих и ретровируса принимают близкие конформационные состояния. Во всяком случае, различия в значениях двухгранных углов ингибитора ренина и HIV-1 протеиназы не больше, чем различия углов ингибиторов одного фермента. Этот факт, как и данные табл. 1.2, свидетельствует о близких структурных мотивах субстратсвязывающих центров аспартатных протеиназ, независимо от их источника.

Рентгеноструктурный анализ ингибиторного комплекса ренина мыши с декапептидом позволил идентифицировать аминокислотные остатки фермента, формирующие специфические карманы, и сделать некоторые количественные оценки их взаимодействий с боковыми цепями остатков ингибитора [391]. Учитывая близость последнего к N-концевой последовательности ангиотензиногена, полученные здесь данные представляют несомненный интерес для последующего теоретического изучения невалентных взаимодействий ренина с истинным субстратом и решения задачи о природе его исключительной специфичности.

В табл. 1.4 представлены 34 остатка ренина, образующие десять

**Изменение доступной растворителю контактной площади остатков активного центра
ренина при ингибировании СН-66 [391]**

Остаток	Свободный ренин, Å ²	Комплекс СН-66, Å ²	Разница, Å ²
Leu-10	37,3	30,1	7,2
Ser-12	7,1	0,2	6,9
Gln-13	7,3	1,0	6,3
Ile-30	4,8	1,8	3,0
Asp-32	3,2	0,0	3,2
Ser-35	2,7	0,0	2,7
Ile-73	3,3	0,1	3,2
His-74	33,1	19,2	13,9
Tyr-75	11,7	0,0	11,7
Gly-76	4,2	0,3	3,9
Ser-77	15,2	4,2	11,0
Ile-110	36,1	32,2	3,9
Pro-111	13,1	1,2	11,9
Phe-112	3,6	0,6	3,0
Leu-114	34,9	21,5	13,4
Phe-117	7,2	0,1	7,1
Val-120	3,6	0,0	3,6
Gln-128	14,0	5,5	8,5
Val-130	14,2	9,9	4,3
Val-213	5,1	0,8	4,3
Asp-215	4,8	0,0	4,8
Ser-218	5,7	0,0	5,7
Ser-219	10,2	0,4	9,8
Phe-220	12,4	2,5	9,9
Leu-276	12,7	7,1	5,6
Thr-283	9,3	5,7	3,6
His-287	16,0	4,8	10,2
Met-289	18,5	14,3	4,2
Ile-291	10,3	0,5	9,8
Pro-292	30,0	19,0	11,0
Pro-294	37,6	29,5	8,1
Thr-295	25,4	10,0	15,4
Val-300	5,6	0,2	5,4

субстратсвязывающих карманов (S'_6 — S'_4), межатомные контактные расстояния которых с ингибитором в комплексе не превышают 4,2 Å. Приведенные в таблице остатки находятся на поверхности глобулы водорастворимого белка и, тем не менее, все они (за естественным исключением каталитически важных Asp-32 и Asp-215), как и

взаимодействующие с ними остатки субстрата, являются гидрофобными. Поэтому стабилизация комплекса осуществляется, главным образом, за счет дисперсионных сил.

О высокой комплементарности потенциальных поверхностей активного центра ренина и декапептидного ингибитора (субстрата), а следовательно, их предрасположенности к эффективным невалентным взаимодействиям можно судить по многочисленности межатомных контактов фермента с лигандом. Количественно это подтверждают данные, представленные в табл. I.5, и показывающие резкое сокращение при сорбции ингибитора доступной растворителю поверхности аминокислотных остатков, образующих локусы $S'_6-S'_4$. Около половины остатков, в том числе Asp-32, Asp-215 и некоторые остатки флепа, оказываются полностью экранированными лигандом от контактов с внешней средой. Доступная растворителю общая площадь активного центра $\sim 460 \text{ \AA}^2$ уменьшается в комплексе до $\sim 220 \text{ \AA}^2$.

В табл. I.6 сопоставлены поверхностно-доступные площади боковых цепей остатков $P_5-P'_4$ ингибитора СН-66 в двух комплексах — с ренином и эндотиопепсином. Согласно расчету К. Дилвиса и соавт., в первом случае такая площадь равна $\sim 64 \text{ \AA}^2$, а во втором — $\sim 130 \text{ \AA}^2$ [391]. Данные табл. I.6 свидетельствуют о значительно большей плотности упаковки одного и того же ингибитора в активном центре ренина по сравнению с эндотиопепсином. Особенно высокая комплементарность в рениновом комплексе имеет место в средней части декапептидного лиганда, т.е. в области расщепляемой пептидной связи.

Главные цели изучения биокатализа, по-видимому, можно ограничить следующими тремя. Во-первых, достижением понимания принципов стереохимического механизма ферментативного катализа и возможностью количественного описания, исходя из знания структур взаимодействующих молекул, каталитического акта как спонтанно протекающего, взаимообусловленного на всех своих стадиях непрерывного процесса. Во-вторых, выяснением в каждом конкретном случае причины специфичности фермент-субстратных и фермент-ингибиторных взаимодействий. В-третьих, целенаправленным конструированием наборов ингибиторов, обладающих наперед заданными свойствами. Возникающие при достижениях этих целей проблемы и возможные подходы к их разрешению будут подробно обсуждены в четвертом томе монографии "Проблемы белка". А сейчас попытаемся ответить на вопрос о том, что нового привнес рентгеноструктурный анализ в изучение аспартатных протеиназ и в какой мере знание трехмерных структур ферментов и их ингибиторных комплексов смогло углубить понимание механизма каталитической реакции аспартатных протеиназ. Ответ на этот вопрос имеет общее для энзимологии значение, поскольку, как отмечалось, протеиназы являются наиболее изученными во всех отношениях объектами биокатализа. Рассмотрим гипотетические модели механизма действия аспартатных протеиназ, в основу разработки которых были положены данные о трехмерных

Сравнение поверхностно-доступных площадей боковых цепей остатков P_5-P_4' ингибитора СН-66 в комплексах с ренином и эндотииопепсином

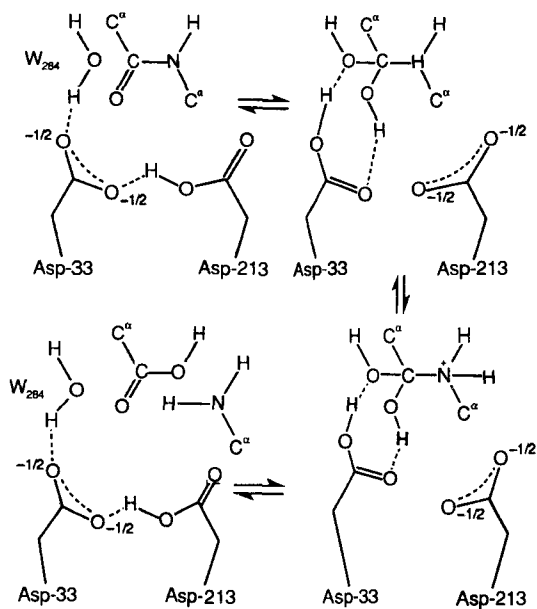
Остаток	Доступная растворителю поверхность СН-66 в комплексе с, Å ²		Разница, Å ²
	ренином	эндотииопепсином	
P_5 His	20,6	35,7	15,1
P_4 Pro	7,7	11,3	3,6
P_3 Phe	0,4	6,9	6,5
P_2 His	0,5	8,7	8,3
P_1 Leu(ψ)	0,0	0,5	0,5
P_1' Leu	0,6	0,9	0,3
P_2' Tyr	7,8	7,2	-0,6
P_3' Tyr	12,4	38,0	25,6
P_4' Ser	13,9	20,2	6,3

структурах ферментов и их комплексов с субстратоподобными ингибиторами.

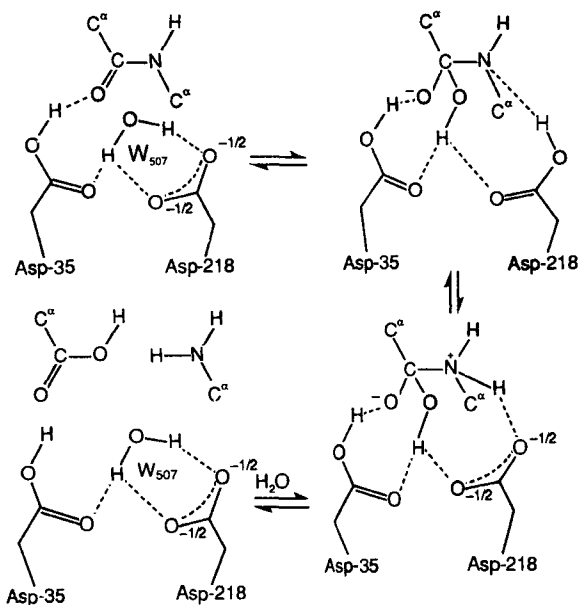
О механизме каталитической реакции аспартатных протеиназ.

Первую стереохимическую модель предложили М. Джеймс и А. Силецки [392] в 1985 г., используя для этого кристаллографическую структуру молекулы пенициллопепсина, расшифрованную с разрешением 1,8 Å [356, 392]. О механизме действия аспартатных протеиназ ранее был высказан ряд соображений, опирающихся на знание трехмерных структур ферментов [368, 393—397]. Однако все они имели незавершенный характер и не претендовали на последовательное описание всего процесса гидролиза пептидной связи, катализируемого аспартатными протеиназами. В стереохимической модели продуктивного ковалентного комплекса Михаэлиса, построенного Джеймсом и Силецки, важная роль принадлежит молекуле кристаллизационной воды W_{284} . В активном центре пенициллопепсина она занимает место, одновременно удобное и для образования с боковой цепью Asp-33 эффективной водородной связи, что повышает ее нуклеофильность, и для атаки на атом карбонильного углерода гидролизуемой связи, что ведет к ослаблению последней. В этом же направлении действует протонированная карбоксильная группа остатка Asp-213, поляризующая посредством водородной связи карбоксильную группу субстрата и выступающая таким образом в качестве электрофильного компонента системы (рис. 1.23).

Отмеченные три взаимодействия инициируют разрушение делокализованной n - π -электронной системы расщепляемой пептидной связи,



Р и с. I.23. Схема механизма катализа аспартатных протеиназ, предложенная М. Джеймсом и А. Силецки [392]

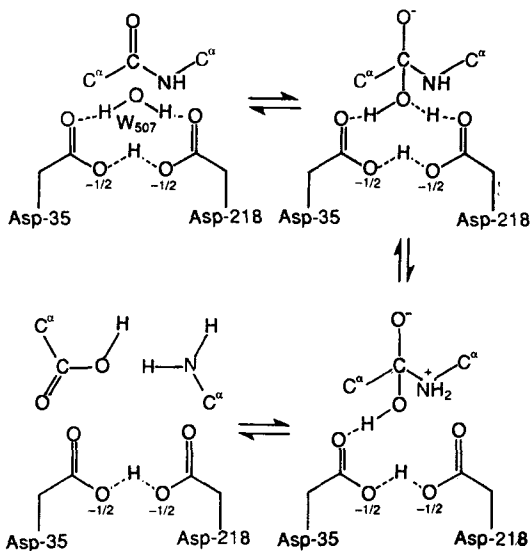


Р и с. I.24. Схема механизма катализа аспартатных протеиназ, предложенная К. Сугуной и соавт. [369]

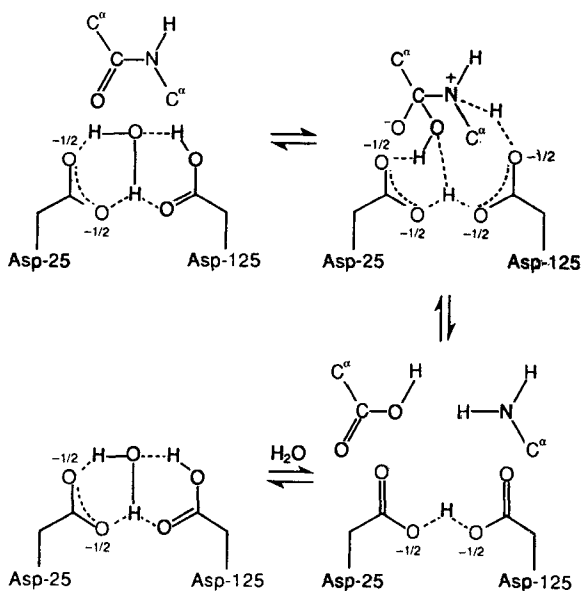
пирамидализацию атомов азота и карбонильного углерода, появление при последнем гем-гидроксильных групп, вовлеченных в водородное связывание протонированной карбоксильной группой Asp-33. В результате образуется тетраэдрическое промежуточное соединение. Возвращение неподеленной пары электронов к атому азота усиливает его склонность к протонизации, которая, по мнению авторов, может осуществляться двумя равновероятными способами [392]. В одном из них предполагается инверсия конфигурации связей атома N, происходящая путем поворота аминной группы субстрата на $\sim 60^\circ$ вокруг связи C—N. В результате неподеленная пара оказывается экспонированной в сторону растворителя, и азот легко поддается протонизации, особенно у аспартатных протеиназ с сильно кислым pH оптимумом. Альтернативный способ включает переход протона к атому N от одной из гидроксильных групп тетраэдрического аддукта, находящегося в син-конфигурации по отношению к неподеленной электронной паре азота. Образовавшееся соединение неустойчиво и распадается на две части, одна из которых включает амино-, а другая — карбоксильную группу (рис. 1.23).

Исходное предположение М. Джеймса и А. Силецки, состоящее в том, что нуклеофилом в каталитической реакции аспартатных протеиназ является молекула W_{284} , оспаривается К. Сугуной и соавт., имеющими иное видение механизма действия ферментов [369]. Сконструированная ими стереохимическая модель основана на кристаллографических данных о трехмерных структурах нативного ризопусепсина [367] и его комплекса с октапептидным ингибитором с восстановленной пептидной связью, расщепляемой в случае субстрата. В качестве нуклеофила авторы работы выбрали молекулу воды W_{507} (W_{39} в нумерации пенициллопепсина), локализованную между двумя карбоксильными группами остатков Asp-35 и Asp-218 и образующую с ними три водородные связи (рис. 1.24) [369]. Предполагается, что молекула W_{507} не подвергается вытеснению субстратом, поскольку при его сорбции гидролизуемая пептидная связь, испытывая стерические затруднения, принимает неплоскую, энергетически невыгодную конфигурацию. В этом положении субстрата карбонильный углерод расщепляемой связи оказывается против атакующего атома кислорода W_{507} , а кислород карбонильной группы располагается на оптимальном для водородной связи расстоянии от гидроксила боковой цепи Asp-35. В результате образования тетраэдрического аддукта группа OH молекулы воды переходит к субстрату, а атомы H сначала к внешнему кислороду боковой цепи Asp-218, а затем к азоту. Реорганизация промежуточного соединения ведет к разрыву пептидной связи субстрата, десорбции продуктов реакции и восстановлению активного центра.

В схеме каталитической реакции аспартатных протеиназ, предложенной Л. Пёрлом [398], нуклеофилом, как и в только что рассмотренной схеме К. Сугуны и соавт., является молекула воды W_{507} (рис. 1.25). Новое в модельном описании Пёрла состоит в предположении равенства констант кислотности и, следовательно, электронной эквивалентнос-



Р и с. I.25. Схема механизма катализа аспаратных протеиназ, предложенная Л. Пёрлом [398]



Р и с. I.26. Схема механизма катализа аспаратных протеиназ, предложенная М. Яскольски и соавт. [374]

ти карбоксильных групп остатков Asp-35 и Asp-218, имеющих обобщенный протон, и, кроме того, во введении в качестве электрофильного компонента, дополнительно поляризирующего карбонильный кислород расщепляемой связи, двух групп NH остатков Gly-78 и Asp-79 (нумерация ризопусепсина), которые входят в последовательность нависающего над субстратом флепа. Действия нуклеофила и электрофила в согласии с предыдущими моделями механизма функционирования аспартатных протеиназ приводят к образованию неустойчивого промежуточного соединения, распадающегося на H_2N — и — COOH продукты реакции. И в этом случае, как в рассмотренных выше, автор следует концепции напряжения и принудительной деформации, т.е. постулирует возможность трансформации энергии фермент-субстратных невалентных взаимодействий в энергию искажения пептидной связи, приближающего ее к переходному состоянию и тем самым облегчающего гидролиз.

Модель механизма действия аспартатных протеиназ, предложенная М. Яскольски и соавт. [374], основана на трехмерной структуре ретровируса HIV-1 протеиназы. В качестве нуклеофила и здесь выбирается молекула W_{507} (нумерация пенициллопепсина), расположенная на равных расстояниях между боковыми цепями остатков Asp-25 и Asp-125 (рис. 1.26). Учитывая симметрию фермента, авторы поместили одну из гидроксильных групп H_2O вдоль оси второго порядка таким образом, что она может образовывать бифуркационную водородную связь с внутренними карбоксильными атомами кислорода остатков аспарагиновой кислоты. Вторая гидроксильная группа H_2O направлена к внешнему кислороду боковой цепи Asp-25. Кислый протон неионизованной боковой цепи Asp-125 образует водородную связь с атомом кислорода молекулы кристаллизационной воды W_{507} . Таким образом, согласно динамической модели Яскольски и соавторов, нативная HIV-1 протеиназа в равновесном состоянии обладает симметричной системой из пяти атомов кислорода, в поле которых соответствующим образом мигрируют атомы водорода. Симметрия активного центра нарушается при взаимодействии фермента с субстратом. В результате нуклеофильной атаки одновременно разрушается карбонильная группа расщепляемой связи, изменяется гибридизация атомов углерода и азота ($\text{sp}^2 \rightarrow \text{sp}^3$), возникает валентная связь C—OH и происходит протонизация азота. Иными словами, фермент-субстратный комплекс проходит в одну стадию неустойчивое промежуточное состояние, которое завершается образованием продуктов реакции и возвращением фермента в исходное положение.

Высказанные в литературе суждения о стереохимии аспартатных протеиназ отличаются количеством элементарных стадий каталитического акта, положением молекулы воды, осуществляющей нуклеофильную атаку на карбонильный углерод расщепляемой связи, атомными группами, поляризирующими кислород этой же связи и способом протонизации атома азота. Несмотря на существенные различия предложенных моделей, они едины в следующих своих исходных положениях.

Во-первых, предполагается, что аспартатные протеиназы функционируют по принципу общего катализа и, следовательно, по ходу реакции не образуют с субстратом ковалентных промежуточных комплексов.

Во-вторых, утверждается, что для реализации каталитического действия протеиназ необходимо наличие в системе нуклеофила, основного и кислотного катализаторов (расхождение — в их выборе).

В-третьих, во всех гипотезах предполагается, что ферментативная реакция гидролиза пептидной связи проходит стадию неустойчивого промежуточного соединения (тетраздрического аддукта).

Эти положения были сформулированы и подтверждены экспериментально при изучении ферментативных и модельных неферментативных реакций еще до того, как был выполнен рентгеноструктурный анализ хотя бы одной молекулы аспартатной протеиназы. Ставшие известными трехмерные структуры ферментов и их комплексов с субстратоподобными ингибиторами дополнительно подтвердили некоторые из ранее сделанных заключений и позволили визуализировать уже сложившиеся представления.

В-четвертых, во всех предложенных стереохимических моделях общей является трактовка побудительных мотивов функционирования аспартатных протеиназ, основывающаяся на концепции деформации и напряжения [399].

Таким образом, разработанные схемы ферментативного катализа примечательны в том отношении, что они исходят, по существу, из одного и того же экспериментального материала, включающего данные рентгеноструктурного анализа, полученные в последние годы, и базируются на одних и тех же теоретических представлениях о природе биокатализа, сложившихся до становления кристаллографии белков и давно ставших традиционными. На несовершенство сделанных обобщений указывает то обстоятельство, что при единстве исходного опытного материала и теоретической основы, а также в рамках одного подхода была предложена не одна стереохимическая модель функционирования аспартатных протеиназ, а четыре различные модели, которых, впрочем, могло бы быть и больше. Они не образуют ряда, свидетельствующего о количественном развитии знаний о механизме действия ферментов, а скорее представляют собой букет различных точек зрения. Рассмотренные гипотезы отвечают одному уровню понимания изучаемого явления и равноценны как в своей аргументации, так и предсказательной силе. Что же привнесла нового в изучение каталитических реакций аспартатных протеиназ и других ферментов рентгеновская кристаллография белков?

Прежде всего следует отметить, что данные рентгеноструктурного анализа позволили определить область активного центра фермента и его геометрию на уровне координат атомов. Сделать это с такой же полнотой и степенью надежности другим способом в настоящее время не представляется возможным. Использование данного метода для расшифровки трехмерных структур нативного фермента и его комплексов с различными ингибиторами позволило выявить конформа-

ционные перестройки активного центра, которые могут иметь место на разных стадиях каталитического акта. Эти данные так же уникальны и информативны. Велика роль рентгеноструктурного анализа в исследовании специфичности фермент-субстратных взаимодействий и локализации областей связывания активного центра с чувствительными местами субстрата и примыкающими к нему с обеих сторон остатками. Что же касается взаимной ориентации расщепляемой связи относительно каталитически активных остатков фермента, отвечающих продуктивному связыванию истинного субстрата, то вопрос остается нерешенным. Высказанные мнения, как это видно на примере предложенных четырех различных стереохимических моделей функционирования аспартатных протеиназ, могут подразделяться на более или менее правдоподобные, однако все они, несмотря на знание конформаций фермента в нативном состоянии и в комплексе с ингибитором, имеют лишь гипотетический характер.

Рассмотренный материал об аспартатных протеиназах, как и подобный материал о химотрипсине, трипсине, карбоксипептидазе и лизоциме, изложенный ранее [400], дает основание заключить, что появление уникальной количественной информации о пространственном строении ферментов и их комплексов не привело к концептуальному развитию энзимологии и переосмыслению сложившихся представлений о природе биокатализа. Ставшие доступными рентгеноструктурные данные не вызвали принципиальных изменений в понимании явления ферментативного катализа и не нашли строгого объяснения в рамках сформулированных в 1950-е годы концепций, равно как и наоборот — последние не получили на основе новых структурных данных своей объективной трактовки. Данные рентгеноструктурного анализа о трехмерных структурах ферментов не изменили направленность исследований каталитических реакций "от функции к структуре", которой энзимология следует с момента своего становления, т.е. более 150 лет.

Первая, главная причина отсутствия ощутимого прогресса в понимании природы ферментативного катализа касается пространственной организации белковых молекул, без знания принципов которой невозможно теоретическое развитие энзимологии. О том, что должного понимания структурной организации ферментов, действительно, нет, свидетельствует как само многообразие существующих концепций, отражающих различные, иногда взаимоисключающие представления о конформационных свойствах белков, так и многовариантность в рамках одной концепции стереохимических моделей механизма конкретной каталитической реакции, что продемонстрировано выше на примере аспартатных протеиназ. Необходимые для количественного описания каталитического акта данные о конформационных возможностях фермента и субстрата, их потенции к изменению своих структур не могут быть получены непосредственно из рентгеноструктурного анализа (как и любого другого эксперимента) или эмпирическим путем, без привлечения теоретических и расчетных методов, в конечном счете, без количественной теории структурной организации белков.

Вторая причина заключается в некорректной оценке проблемной

ситуации, проявляющейся во взгляде на ферментативный катализ как на явление, в принципе аналогичное химическому катализу. Нельзя решить задачу структурно-функциональной организации, т.е. создать теорию биокатализа, пытаясь понять механизм ферментативного катализа на основе экспериментальных методов и теоретических подходов органической химии, формальной кинетики и равновесной термодинамики. Механизм каталитического акта фермента не поддается воспроизведению в искусственных условиях и его сопоставление даже с механизмом конгруэнтной системы носит в значительной мере формальный характер, особенно в отношении стереохимии. (Подробно эта тема будет обсуждена в четвертом томе монографии "Проблема белка".)

Третья причина развития теоретической энзимологии за последние десятилетия главным образом в терминологическом и популяризационном планах связана с рядом ограничений самого рентгеноструктурного анализа. Во-первых, несмотря на уникальность и ценность этого метода как практически единственного источника информации о трехмерных структурах белков, получаемые им результаты касаются только статического состояния фермента и, следовательно, прямо не отвечают на вопрос о динамических конформационных и электронных характеристиках активной конформации, что представляет первостепенный интерес в изучении биокаталитического процесса. Выявление потенциальных возможностей объектов исследования и предсказание их поведения — прерогатива теоретического подхода. Во-вторых, рентгеновский метод позволяет расшифровать трехмерные структуры комплексов ферментов, но комплексов не с субстратами, а с ингибиторами. Могут быть получены структурные данные о целой серии ингибиторных комплексов одного фермента, которые в той или иной мере (но всегда неявной) соответствуют химическим элементарным стадиям каталитического акта. Однако в таком наборе все ингибиторы отличаются по своему химическому и пространственному строению как от истинного субстрата, так и друг от друга. Не зная продуктивной ориентации субстрата в активном центре, а также актуальных для катализа фермент-субстратных взаимодействий и обусловленных ими конформационных перестроек и имея дело со сложной системой, трудно составить полное и объективное представление о причинах спонтанного протекания каталитической реакции. Предпринимаемые здесь попытки представляют собой стремление воссоздать механизм каталитического акта, располагая структурными данными, одна часть которых отвечает реальному, исходному состоянию фермента, а другая, большая часть, фермент-ингибиторным комплексам, которые в чем-то (в чем именно, неизвестно) отличаются от промежуточных продуктивных комплексов истинного многостадийного процесса.

Сложившаяся в настоящее время ситуация в энзимологии становится предельно ясной при сопоставлении исследований аспартатных и сериновых протеиназ — ферментов, изученных во всех отношениях наиболее детально. В исследовании аспартатных протеиназ, особенно протеиназ ретровирусов, в конце 1980-х—начале 1990-х годов наблю-

дался тот же стремительный прогресс в получении экспериментального материала, который в изучении сериновых протеиназ имел место в 1970-е годы. Показателен тот факт, что за прошедшие два десятилетия принципиально не изменился уровень теоретической трактовки получаемых результатов.

Итак, с появлением рентгеноструктурного анализа ферментов не произошел переход от умозрительных представлений о ферментативном катализе к строгому количественному описанию этого явления. Не изменилась также направленность биокаталитических исследований, по-прежнему следующих от функции к структуре, что неслучайно, поскольку результатом рентгеноструктурного исследования может быть лишь знание морфологии биосистем атомно-молекулярного уровня, которое само по себе не является конечной целью изучения ферментов. Морфология объекта — это всегда нечто предварительное и совершенно необходимое для последующего изучения структурной и структурно-функциональной организации биосистем. Выявление с помощью рентгеноструктурного анализа пространственного строения многих сотен молекул ферментов не решило проблему биокатализа, но сделало реальным разработку подхода к изучению ферментативного катализа в направлении от структуры к функции и априорному количественному описанию механизма каталитической реакции. Благодаря развитию кристаллографии белков проблема создания общей теории биокатализа и соответствующих методов расчета впервые обрела форму подлинно научной проблемы, решаемой на уровне современных естественнонаучных знаний.

3.4. ДНК-СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ

В этом разделе изложены некоторые кристаллографические исследования белков последних лет, которые подтверждают уникальность получаемой с помощью рентгеноструктурного анализа информации и ее определяющее значение в решении проблемы межмолекулярных взаимодействий аминокислотных последовательностей. Кроме того, рассматриваемые ниже работы демонстрируют новейшие достижения кристаллографии, позволившие расшифровывать на атомном уровне трехмерные структуры белков и комплексов, состоящих из тысячи и более аминокислотных остатков. В данном случае, чисто техническое развитие метода, о чем будет говориться в следующей главе, проявилось в наметившемся в начале 1990-х годов переходе от рентгеноструктурных исследований отдельных белковых молекул к не менее детальному изучению пространственных структур макромолекулярных белковых олигомеров, их агрегатов с другими соединениями и субклеточными системами. Иными словами, на атомном уровне стали осваиваться структуры более сложных биологических систем. Это значительное событие в молекулярной биологии, новый этап ее развития. Он отражает современную тенденцию эволюции биологи-

ческих знаний, впервые возникшую после того, как наука о живой природе, достигнув в середине XX столетия атомно-молекулярного уровня биосистем, получила возможность развиваться одновременно в двух встречных направлениях: традиционном "от сложного к простому", и новом "от простого к сложному", от биомолекул вверх по иерархической лестнице живого.

Для рассмотрения были выбраны такие объекты, которые были интересны в отношении своей структурно-функциональной организации и в то же время наглядно иллюстрировали сегодняшние достижения кристаллографии белков. К ним, безусловно, относятся ДНК-связывающие белки, принимающие прямое участие как в создании генетического аппарата, так и на всех стадиях его функционирования. Предварительно приводится несколько соображений общего характера о специфических особенностях структурной организации белков и двухцепочечных молекул ДНК.

Белки фактически являются единственным классом соединений, химические свойства которых нельзя непосредственно соотнести с химическим строением молекул. Их поведение и исключительная роль в процессах жизнедеятельности определяются особой, только им присущей молекулярной структурной организацией. За единичными исключениями лишь белковые цепи способны самопроизвольно сворачиваться в строго детерминированные структуры, геометрия и конформационная динамика которых обусловлены аминокислотной последовательностью. Белки несопоставимы по своему функциональному разнообразию с действиями какого-либо другого класса молекул живой и неживой природы. В то же время, при функциональной универсальности природных аминокислотных последовательностей свойства каждого отдельного белка уникальны в отношении физиологической функции, механизма ее реализации, зависимости от внешних условий, природы лиганда и растворителя. Очевидно, поэтому назначение генетического аппарата любого организма сведено к хранению информации только о белках и их синтезе, а биосистемы всех уровней, включая молекулярный, можно считать "произведениями" белков. Последние не только синтезируют почти все соединения живой природы, но и способствуют приданию им пространственной формы, необходимой для протекания процессов жизнедеятельности.

Таким образом, белок – это активное начало всего живого, а его способность к структурной организации собственной аминокислотной последовательности и других молекул является элементарным фундаментальным качеством живой материи, которое обуславливает специфические особенности биологических систем всех последующих уровней. Своеобразие белков особенно отчетливо проявляется при сопоставлении с молекулами другого важнейшего класса природных соединений, дезоксирибонуклеиновых кислот. Если белок является активным началом живой материи, то ДНК следует отнести к ее потенциальному началу, которое, однако, молекула нуклеиновой кислоты не в состоянии самостоятельно реализовать ни в отношении собственной пространственной формы, ни в отношении своей функции.

Любая биологически целенаправленная активация ДНК происходит только под воздействием белков и при их непременном участии на всех стадиях последующего процесса. Проявление функциональных свойств ДНК немыслимо без участия множества различных так называемых ДНК-связывающих белков. В эукариотических клетках они традиционно подразделяются на две группы – гистоновые белки, участвующие в создании определенной структуры ДНК внутри клеточного ядра, и не-гистоновые белки, обеспечивающие биосинтез РНК. Ниже рассматриваются результаты рентгеноструктурного анализа гистонов и β -галактозидазы, представителей обеих групп ДНК-связывающих белков.

Структура гистонового кора нуклеосомы. Гистоны объединяют пять разновидностей небольших структурных белков Н1, Н2А, Н2В, Н3 и Н4, аминокислотные последовательности которых содержат соответственно 220, 128, 124, 134 и 102 остатков. Они обеспечивают плотную упаковку двойной спирали ДНК, которая в растянутом состоянии имеет большую длину. Например, в каждой хромосоме человека она составляет в среднем около 5 см. Поэтому компактизация ДНК с помощью гистонов необходима прежде всего для упорядоченного расположения длинной двухцепочечной полинуклеиновой кислоты в небольшом объеме клеточного ядра. Однако не только для этого: характер упаковки ДНК влияет на активность соответствующих участков генома. Следовательно, его гистоновая структурная организация является одним из способов регуляции и контроля транскрипции РНК с ДНК. Аминокислотные последовательности гистонов содержат около четверти положительно заряженных остатков Lys и Arg, что позволяет им эффективно связываться с двойной спиралью ДНК, независимо от ее нуклеотидного состава.

Гистоны, особенно Н2А, Н2В, Н3 и Н4, относятся к самым консервативным из известных белков. В табл. I.7 сопоставлены скорости изменений аминокислотных последовательностей ряда белков и гистона Н4 на протяжении эволюционного времени. Приведенные цифры позволяют считать, что в гемоглобине вредными оказываются примерно четыре из каждых пяти случайных аминокислотных замен, в

Т а б л и ц а I.7

Скорости изменения аминокислотных последовательностей белков на протяжении эволюционного времени [401]

Белок	Единица эволюционного времени, млн. лет*	Белок	Единица эволюционного времени, млн. лет*
Фибринопептид	1,2	Цитохром с	21,0
Гемоглобин	6,1	Гистон Н4	600,0

* Единица эволюционного времени – среднее время, необходимое для того, чтобы в данном белке на каждые 100 его аминокислотных остатков могла появиться одна приемлемая замена.

цитохроме с – 17 из каждых 18, в гистоне же Н4 невредных замен практически нет. Поскольку все пары оснований ДНК подвержены случайным мутациям в равной мере, то эволюционная стабильность гистонов предполагает их чрезвычайно ответственную роль в организации и функционировании генетического аппарата.

Гистоны составляют около половины массы хромосомы, где они участвуют в организации нескольких уровней упаковки двойной спирали ДНК. Вместе с другими белками гистоны образуют с ДНК комплексы, названные хроматином. Впервые Р. Корнберг в 1974 г. выделил повторяющуюся структурную единицу хроматина и вместе с Дж. Томасом установил, что она состоит из белковой сердцевины октамерного кора, содержащего по две молекулы каждого из гистонов Н2А, Н2В, Н3 и Н4, и фрагмента двойной спирали ДНК [402, 403]. Р. Симпсон предположил, что двухцепочечная ДНК закручена вокруг гистонового кора и образует два витка суперспирали из 165 пар оснований [404]. Позднее эта цифра была исправлена А. Клаггом и соавт. на 146 [405]. Обнаруженная структурная единица хроматина получила название нуклеосомы [406]. Исследования гистонового кора с помощью различных физико-химических методов показали, что октамер представляет собой гетерогенный белковый ансамбль $(\text{Н2А}-\text{Н2В}-\text{Н3}-\text{Н4})_2$, состоящий из трех структурных субъединиц: тетрамера $(\text{Н3}-\text{Н4})_2$ и двух димеров $(\text{Н2А}-\text{Н2В})$. Двойная спираль ДНК в хроматине тянется как непрерывная нить от одной нуклеосомы к другой. Расположенные между нуклеосомами линейные линкерные участки ДНК имеют разную длину, которая обычно невелика и в среднем составляет 60 нуклеотидов. Нуклеосомная нить определяет более высокие уровни компактизации хроматина. В конечном счете, он предстает в электронном микроскопе в виде так называемой 30нм-хроматиновой фибриллы.

За укладку нуклеосомной нити в составе хроматиновой фибриллы отвечает гистон Н1. Центральная часть его молекулы представляет собой глобулу, которая взаимодействует со специфическим участком нуклеосомы. N- и C-концевые фрагменты белка имеют вытянутые формы. Один из них (N-) ассоциирован с предшествующей линкерной ДНК в области ее контакта с нуклеосомной частицей, а другой – с гистоновым кором последующей нуклеосомы. Кроме того, замечено, что свободная молекула Н1 легче взаимодействует с ДНК в непосредственной близости от другой, уже присоединившейся молекулы гистона, чем отдельно от нее [407]. Этим обусловлена склонность белков Н1 связываться с ДНК группами по восемь и более молекул. Предполагается, что взаимодействие такого типа, названное кооперативным связыванием, лежит в основе активации генов. Вызванная им конденсация молекул гистона Н1 превращает некоторые хроматиновые участки в своеобразные микрокристаллы, "плавление" которых под действием внешнего регуляторного сигнала ведет к разрушению гистонового кластера и локальной перестройке хроматина [401, 408].

Вернемся, однако, к гистоновому кору нуклеосомы, главному

объекту нашего рассмотрения. Выяснение его внутренней структурной организации и взаимодействий с двойной спиралью ДНК началось, как уже отмечалось, в 1974 г. [402]. Вскоре структура октамера была изучена в растворе методами малоуглового рассеяния нейтронов и рентгеновских лучей с разрешением $\sim 20 \text{ \AA}$ [409–411] и в кристаллическом состоянии – с помощью рентгеноструктурного анализа в работах [405, 412, 413] (разрешение $\sim 22 \text{ \AA}$), [414] ($7,0 \text{ \AA}$) и [415, 416] ($3,5 \text{ \AA}$). Согласно кристаллографическим данным Р. Бёрлингейма и соавт., исследовавших чистый гистоновый кор эритроцита цыпленка, октамер имеет форму эллипсоида $110 \text{ \AA}$ в длину и $65\text{--}70 \text{ \AA}$ в диаметре [416]. Предложенная авторами этой работы модель состояла из трех частей: центрального тетрамера $(\text{H3--H4})_2$ и расположенных на его противоположных сторонах двух димеров (H2A--H2B) . Однако как форма, так и размеры октамера существенно отличались от параметров, полученных в ряде других исследований [405, 412–414]. Повторный рентгеноструктурный анализ, проведенный Бёрлингеймом и соавт. [415, 416], привел к внешним размерам гистонового кора, которые совпали с данными других работ (высота $\sim 55 \text{ \AA}$, диаметр $\sim 70 \text{ \AA}$) [417, 418].

Некоторым авторам трехмерная структура гистонового кора напоминает плоский диск, другим шпильку или катушку, третьим клин. При таком разном видении ясно лишь одно – структура октамера достаточно сложна и не имеет прямых аналогий. Более детальное обсуждение геометрии комплекса $(\text{H2A--H2B--H3--H4})_2$ может опираться только на результаты последующих исследований, так как они получены с разрешением $3,1 \text{ \AA}$, уже позволяющим идентифицировать конформационные состояния аминокислотных остатков и даже отдельных боковых цепей [417, 418].

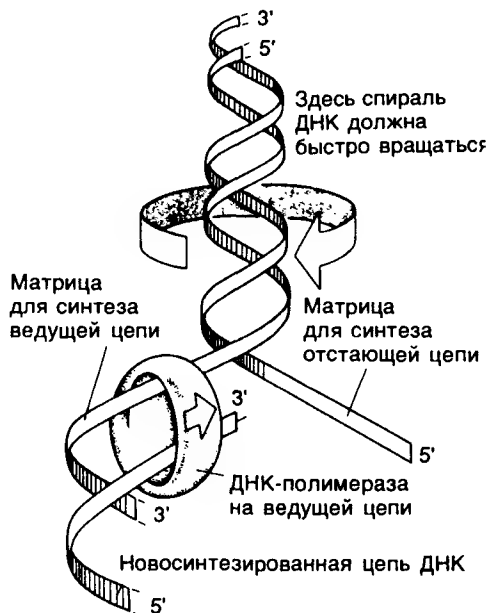
Ранее, при рентгеноструктурном анализе целой нуклеосомы было показано, что правая двойная спираль ДНК закручена вокруг гистонового кора в виде левой суперспирали с внутренним диаметром $\sim 70 \text{ \AA}$ и длиной $\sim 55 \text{ \AA}$ [404, 409, 412]. Это нашло подтверждение в исследовании структуры изолированного октамера, на поверхности которого была обнаружена бороздка белковой суперспирали [417, 418]. Она имеет внешний диаметр $\sim 65 \text{ \AA}$, шаг $\sim 28 \text{ \AA}$ и левую закрутку, что полностью отвечает параметрам суперспирали ДНК в нуклеосоме. Таким образом, поверхности гистонового кора и закручиваемой вокруг него двойной спирали ДНК соотносятся между собой так же, как поверхности винта и гайки. Между тем, образование нуклеосомы вряд ли представляет собой ввинчивание белкового октамера в строго детерминированную нуклеотидную структуру. Этому препятствуют, во-первых, наличие на спиральной бороздке нуклеосомного сердечника чередующихся возвышений и впадин и, во-вторых, то обстоятельство, что суперспираль молекулы ДНК в свободном состоянии не является стабильной формой, хотя, по-видимому, и относится к низкоэнергетическим конформациям. Более вероятно, что образование нуклеосомы происходит путем накручивания лабильной двойной спирали ДНК на

гистоновый кор, подобно наматыванию нитки на катушку. Таков же механизм и противоположного процесса освобождения двухцепочечной ДНК от белкового комплекса. В пользу этой модели свидетельствует комплементарность возвышений и впадин внутренней центральной части нуклеосомы профилю контактной поверхности суперспирали ДНК, образованной В-формой ее двойной спирали.

В связи с установлением трехмерной структуры гистонового октамера (H2A–H2B–H3–H4)₂ и его стерических взаимоотношений с ДНК встает ряд вопросов принципиального порядка. Например, каковы механизмы и причины спонтанного возникновения белкового комплекса и самосборки нуклеосомы в целом? Не менее интересен и вопрос о том, каким образом происходит освобождение нуклеотидной цепи от гистонового кора? Дело в том, что доступность ДНК, входящей в состав нуклеосом, существенно ограничена на тех участках, где двойная спираль соприкасается с поверхностью октамера. Присоединение специфических регуляторных белков к функционально активным нуклеотидным последовательностям становится возможным только при освобождении соответствующих участков связывания ДНК от нуклеосом. Поэтому выяснение причины распада нуклеопротеиновых комплексов столь же важно, как и исследование причины их возникновения. Можно полагать, что после того, как механизм создания и разрушения нуклеосом получит свою количественную трактовку, будет решен и один из наиболее интригующих вопросов, касающихся гистоновых белков, а именно, почему гистоны H2A, H2B, H3 и H4 в отношении своих аминокислотных последовательностей являются самыми консервативными в природе белками (табл. 1.7)? Не исключено, что нуклеосома представляет собой уникальную по своей структурной организации клеточную субъединицу. Из общих соображений очевидно, что в ней должны сочетаться идеальная согласованность внутри- и межмолекулярных взаимодействий белков, образующих гистоновый октамер, комплементарность поверхности нуклеосомного кора контактной поверхности суперспирали ДНК и в то же время наличие тонкого баланса сил противоположной направленности, нарушение которого при соответствующих изменениях внешних условий ведет к быстрому смещению равновесия в сторону возникновения или распада нуклеопротеинового комплекса. Консервативность гистонов H2A, H2B, H3 и H4 указывает на то, что нормальное функционирование такой системы практически исключает аминокислотные замены.

Вопросы, касающиеся природы и механизма взаимодействия гистонов друг с другом и двойной спиралью ДНК, возникли задолго до привлечения к их рассмотрению рентгеноструктурного анализа. И хотя установление трехмерной структуры нуклеосомы окончательно не решило ни одного из них, ситуация в этой области претерпела качественное изменение. Стала известна морфология изучаемого объекта, и все вопросы о его функционировании перешли из натурфилософской категории в категорию строго научных. Что это означает, детально рассматривается в двух последующих томах настоящего издания.

Р и с. 1.27. Вращение двойной спирали ДНК при её репликации



Структура N-концевого фрагмента ДНК-топоизомеразы I. При репликации ДНК скорость полимеризации у бактерий и млекопитающих колеблется соответственно от 500 до 50 нуклеотидов в секунду. При этом на каждые 10 пар оснований новосинтезированной цепи родительская двойная спираль ДНК, чтобы не быть запутанной, должна совершать один полный оборот вокруг своей оси (рис. 1.27). Следовательно, для беспрепятственного передвижения репликационной вилки с наблюдаемой на опыте скоростью вся хромосома, находящаяся впереди вилки, должна совершать 50–55 об/с. Аналогичная "проблема кручения" возникает, очевидно, при транскрипции и рекомбинации ДНК. Во всех случаях она решается с помощью особых ферментов, ДНК-топоизомераз, образующих в спиральях своего рода "шарниры".

ДНК-топоизомераза типа I расщепляет фосфодиэфирную связь в одной из цепей ДНК и ковалентно присоединяется, как правило, посредством боковой цепи тирозина к образовавшемуся свободному 5'-концу. Обрыв цепи дает возможность двум половинам двойной спирали свободно вращаться вокруг фосфодиэфирной связи, находящейся напротив разрыва, и тем самым снимать накопившееся напряжение. Ковалентная связь белок–ДНК высокоэнергетична, а поэтому реакция ферментативного гидролиза фосфодиэфирной связи обратима и не требует участия АТФ. После снятия напряжения разорванные концы цепи ДНК соединяются вновь. Таким образом, по своей функции ДНК-топоизомераза представляет собой нечто вроде "обратимой нуклеазы" или "обратимой ДНК-полимеразы". Впервые ДНК-топоизомераза была выделена из клеток *E. coli* Дж. Уангом в 1971 г. [419]. До сих пор она остается наиболее широко изученным ферментом подсемейства ДНК-

топоизомераз типа I, к которому принадлежат открытые много лет спустя топоизомеразы III *E. coli* [420] и *S. cerevisiae* [421, 422], а также обратимая гираза археобактерии *Sulfolobus acidocaldarius* [423, 424]. Помимо описанной реакции ферменты этого типа катализируют релаксацию неправильно закрученной линейной суперспирали ДНК, распутывание и замыкание колец единичной цепи ДНК, спаривание комплементарных колец и ряда других родственных операций. Общим для ДНК-топоизомераз типа I является механизм каталитического акта, протекающего без использования энергии АТФ и непременно включающего стадию временного разрыва только одной цепи двойной спирали ДНК. Аналогичные по функции ферменты, расщепляющие, однако, не одну, а две фосфодиэфирные связи и ковалентно связывающиеся с обеими цепями двойной спирали, составляют подсемейство ДНК-топоизомераз типа II [425].

В 1994 г. Х. Лима, Дж. Уанг и А. Мондрейгон опубликовали результаты рентгеноструктурного анализа пространственного строения N-концевого фрагмента ДНК-топоизомеразы I *E. coli* [426]. Трехмерная структура фрагмента полипептидной цепи из 553 аминокислотных остатков и молекулярной массы 67 кДа (целый белок 97 кДа) была определена с разрешением 2,2 Å при расшифровке дифракционных картин, полученных при температуре кристаллов – 168° и использовании синхротронного излучения. Данная работа – это первое кристаллографическое исследование топоизомеразного объекта.

ДНК-топоизомераза I металлофермент, C-концевой фрагмент которого содержит три атома Zn(II) и три участка с двумя дисульфидными связями [427]. Каталитическая реакция расщепления нуклеотидной цепи ДНК включает трансэтерификацию между фосфодиэфирной связью субстрата и боковой цепью Туг-319 фермента [428]. В этой реакции не участвует C-концевой фрагмент белка с дисульфидными связями. Что касается атомов цинка, то они также не оказывают влияния на стадию расщепления фосфодиэфирной связи, однако необходимы для замыкания разорванной цепи после релаксации ДНК [429]. Поэтому исследованный в работе [426] фрагмент с молекулярной массой 67 кДа ДНК-топоизомеразы типа I может катализировать расщепление единичной нуклеотидной цепи, но не в состоянии восстановить целостность суперспирали ДНК. Его субстратная специфичность и кинетические характеристики такие же, как у нативного белка или белка, лишенного цинка [429, 430].

Трехмерная структура N-концевого фрагмента представляет собой неправильный вытянутый тор с внешними размерами 67×43×86 Å. Он образован четко отделенными друг от друга и хорошо наблюдаемыми четырьмя доменами I–IV (рис. I.28). Вторичные структуры доменов приведены в табл. I.8. В домен III входит каталитически важный остаток Туг-319. Активный центр ДНК-топоизомеразы I, образованный доменами I, III, показан на рис. I.29.

Отверстие тора, свободное от боковых цепей остатков, имеет диаметр около 28 Å, так что вхождение в него двойной спирали ДНК в В-форме не должно сопровождаться стерическими затруднениями.

Вторичные структуры N-концевого фрагмента ДНК-топоизомеразы I (рис. 1.28)

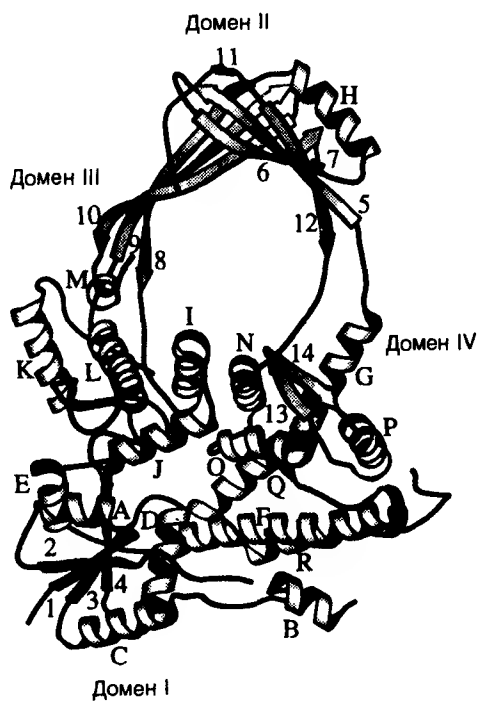
Домен	α -Спираль	β -Структура	Домен	α -Спираль	β -Структура
I	A, C, D, E	1-4	III	I, J, K, L, M	—
II	H	5-12	IV	B, F, G, N, O, P, Q, R	13, 14

Укладка эффективно взаимодействующих между собой доменов I, III и IV привела к образованию большой субстратсвязывающей щели и еще одного отверстия в непосредственной близости от главного отверстия тора и активного центра с аминокислотным остатком Туг-319. Второе отверстие имеет небольшой диаметр, однако достаточный для прохождения единичной цепи ДНК (рис. 1.29).

Общепринятой стала точка зрения, что возникновение по ходу эволюции новых сложных белков происходит путем слияния предсуществующих [431, 432]. При этом трехмерная структура мультидоменного белка представляется ансамблем в значительной мере независимых глобулярных доменов, ранее существовавших как индивидуальные белки, а аминокислотная последовательность — набором полипептидных цепей доменов, в которых С-конец предшествующего соединен с N-концом последующего. Такому способу образования сложных белков никак не соответствует структурная организация ДНК-топоизомеразы, ход полипептидной цепи которой нельзя представить в виде последовательного и независимого образования доменов.

Сборка аминокислотной последовательности фрагмента 67, по-видимому, начинается с N-концевого домена I, состоящего из непрерывного полипептидного участка (рис. 1.30). Затем, вместо того, чтобы сразу направиться к домену II, цепь следует к домену IV и только потом идет к II, завершив, однако, образование IV лишь на одну треть. Далее, поучаствовав и здесь в построении только одной половины домена II, цепь переходит к домену III. По завершении его организации она вновь возвращается сначала к домену II, а затем к IV, заканчивая их построение. При описанном ходе аминокислотной последовательности все взаимодействия домена III с доменами I и IV ограничены невалентными контактами (рис. 1.28, 1.30). Ковалентно связанные между собой домены II, III, полипептидная цепь которых не переплетается с цепью других доменов, могут перемещаться как твердое тело относительно остальной части белка. Такая структурная организация молекулы фермента с двумя формами тора (открытой и закрытой) имеет, по мнению авторов, решающее значение для реализации функции ДНК-топоизомеразы типа I, так как перемещение доменов II и III открывает доступ к активному центру как однопечочной, так и двухпечочной ДНК [426].

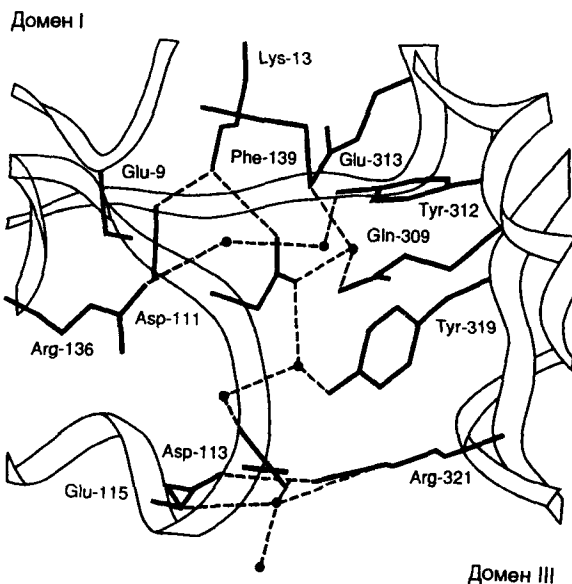
Предположение о необходимости значительных конформационных изменений молекулы ДНК-топоизомеразы в процессе образования невалентного комплекса Михаэлиса подтверждается и рядом других, не менее убедительных структурных особенностей фермента.



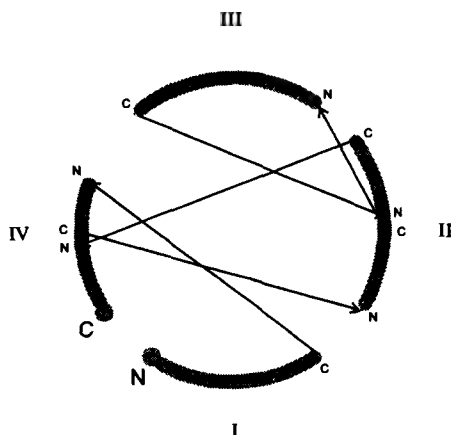
Р и с. I.28. Ленточная диаграмма трехмерной структуры N-концевого фрагмента ДНК-топоизомеразы типа I [426]

Р и с. I.29. Активный центр ДНК-топоизомеразы типа I, образованный доменами I и III

Пунктиром отмечены водородные связи [426]



Р и с. 1.30. Ход полипептидной цепи N-концевого фрагмента ДНК-топоизомеразы типа I



Одна из них касается каталитически наиболее важного остатка Туг-319. Он принадлежит домену III и расположен рядом с субстрат-связывающей цепью. В нативном ферменте Туг-319 помещается в узкой расщелине между доменами I, III и экранирован от контактов с внешней средой белковой цепью Arg-321, образующей солевой мостик одновременно с боковыми цепями Asp-113 и Glu-115. Переход от закрытой формы молекулы к открытой не только делает возможным проникновение ДНК во внутреннюю часть тора, но и выводит остаток Туг-319 на поверхность, предоставляя ему условия для сближения с нуклеотидной цепью субстрата и атаки на фосфодиэфирную связь. Перемещение доменов II, III как целое стимулируется невалентными взаимодействиями белок–ДНК, поскольку такой кофактор, как АТФ, в данном случае отсутствует. Это обстоятельство отличает ДНК-топоизомеразы типа I от типа II, катализ которых также связан с конформационными изменениями, требующими, однако, участия АТФ.

В работе, посвященной трехмерной структуре N-концевого фрагмента ДНК-топоизомеразы I, авторы большое внимание уделяют описанию многих деталей механизма каталитического акта [426]. Однако этот материал, как и в других подобных исследованиях, имеет феноменологический характер [433]. Значение данных рентгеноструктурного анализа ферментов, очевидно, не в том, чтобы подстраивать под них существующие умозрительные схемы катализа или придумывать новые. Они ценны своей научной потенцией, возможностью использования в качестве уникальной экспериментальной основы априорного подхода к количественному описанию каталитического акта как спонтанно протекающего процесса [434].

Структура β -галактозидазы. Включить данный фермент в раздел, посвященный ДНК-связывающим белкам, но не принадлежащий, строго говоря, к таковым, побудили следующие два обстоятельства:

во-первых, структурная организация молекулы β -галактозидазы, которую оказалось интересным сопоставить с только что рассмотренной организацией ДНК-топоизомеразы; во-вторых, участие фермента в регуляции транскрипционной активности ДНК, проявляющейся в его влиянии на эффективность считывания в процессе транскрипции целого кластера генов (включая собственный), ответственных за метаболизм лактозы. β -Галактозидаза сыграла историческую роль в развитии молекулярной биологии, конкретно — представлении об общих молекулярных основах регуляции действия генов. Она явилась именно тем ферментом, изучение биосинтеза которого на уровне транскрипции у бактерий позволило А. Львову, Ф. Жакобу и Ж. Моно в начале 1960-х годов разработать теорию переноса генетической информации и регуляции синтеза белка (концепция оперона). Согласно концепции Львова, Жакоба и Моно, в каждый оперон входят ген-регулятор, промотор, оператор и структурные гены определенных белков (цистроны), с которых транскрибируется соответствующая пРНК (полицистронная РНК) и за работу которых ответственны три предшествующих регуляторных участка двойной спирали ДНК.

Первые исследования механизма генетического контроля были посвящены синтезу β -галактозидазы, осуществляющей гидролиз дисахарида лактозы до моносахаридов глюкозы и галактозы в клетке *E. coli*. Опыты привели к открытию белка-репрессора лактозного оперона, включающего транскрипцию структурных генов (в данном случае, гена β -галактозидазы, а также пермеазы и галактозид-транс-ацетилазы). Это достигается путем связывания репрессора с операторным участком ДНК длиной в 21 нуклеотид, перекрывающимся с последовательностью промотора. В результате блокируется доступ РНК-полимеразы к ее участку связывания и транскрипция цистронов делается невозможной. Для индукции и репрессии синтеза белка, т.е. изменения скорости процесса в противоположных направлениях, необходимо наличие в модели регуляторного механизма еще одного элемента индуктора, который должен, с одной стороны, контролировать действия белка-репрессора лактозного оперона, а с другой — быть связанным прямо или косвенно с функцией синтезируемого фермента. Такой индуктор действительно был обнаружен, и им оказался субстрат β -галактозидазы лактоза, точнее, аллолактоза, близкая по строению и образующаяся в присутствии лактозы.

β -Галактозидаза является индуцибельным ферментом, скорость синтеза которого зависит от состава и условий среды, в частности концентрации лактозы. Количество фермента резко возрастает с ростом концентрации субстрата, так что связь индуктора с β -галактозидазой очевидна. Воздействие лактозы через аллолактозу на репрессор имеет аллостерический характер. Когда внутриклеточное содержание лактозы начинает превышать норму, увеличивается концентрация аллолактозы, которая индуцирует конформационные изменения в молекуле репрессора. Его связь с ДНК ослабляется и он освобождает промотор и тем самым дает возможность РНК-полимеразе транскрибировать гены β -галактозидазы. Наступает дерепрессия гена, образуется пРНК и

начинается синтез фермента, который необходим только тогда, когда в клетке присутствует лактоза.

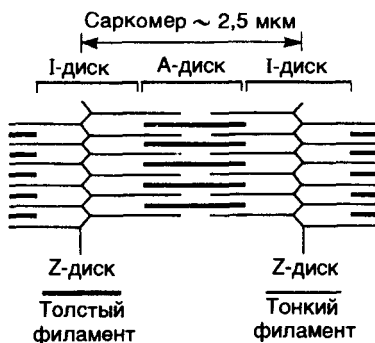
Трехмерная структура β -галактозидазы *E. coli* с разрешением 2,5 Å была недавно исследована Р. Джекобсоном и соавт. [435]. Рентгено-структурный анализ показал, что аминокислотная последовательность белка из 1023 остатков имеет N-концевой α -пептидный участок 1–51 вытянутой формы и пять структурно автономных доменов: 51–217 (I), 220–334 (II), 334–627 (III), 627–736 (IV) и 736–1023 (V). В отличие от ДНК-топоизомеразы типа I, где полипептидная цепь переходит от одного незавершенного домена к другому и, не закончив его построения, направляется к третьему и т.д. (рис. I.30), у β -галактозидазы цепь проходит от N-конца молекулы к ее C-концу через все домены строго последовательно. Тем самым облегчается сборка длинной полипептидной цепи белка, поскольку при модульной структурной организации нативного фермента каждый домен может действовать как независимая свертывающаяся субъединица.

Ферментативную активность проявляет четвертичная структура β -галактозидазы в виде гомотетрамерного невалентного комплекса молекулярной массы 465,412 кДа. Кристаллографический анализ показал, что он принадлежит к точечной группе симметрии 222. Четыре тетрамера составляют асимметричную элементарную ячейку пространственной группы $P2_1$ с параметрами $a = 107,9 \text{ Å}$, $b = 207,5 \text{ Å}$, $c = 509,9 \text{ Å}$ и $\beta = 94,7^\circ$. На сегодняшний день из всех идентифицированных на атомном уровне трехмерных структур белков структура молекулы β -галактозидазы обладает самой длинной полипептидной цепью. Работа Джекобсона и соавт. [435] впервые продемонстрировала возможность исследования невирусных кристаллов белка с размерами элементарной ячейки, превышающими 500 Å, и относительной молекулярной массой ~ 2000 кДа на асимметрическую единицу.

Ранее было показано, что остатки Glu-461, Met-502, Tyr-503 и Glu-537 должны играть важную роль или непосредственно в самой каталитической реакции, или в построении активного центра [436, 437]. Действительно, в найденной пространственной структуре фермента они оказались сближенными друг с другом и расположенными около глубокой ямы, по-видимому, представляющей собой субстратсвязывающий карман. Формирующие его остатки, как и четыре отмеченные выше остатка, относятся к высококонсервативным.

3.5. БЕЛКИ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ

К одному из самых удивительных свойств белков, не проявляющихся у других соединений, относится их способность к макроскопическому, т.е. значительно превышающему размеры собственных молекул, перемещению. Оно обусловлено наличием у ряда белков, получивших название аллостерических, нескольких энергетически наиболее предпочтительных и легко переходящих друг в друга конформаций, чувствительных к изменению внешней среды и избирательно



Р и с. 1.31. Схема строения саркомеры (пояснение в тексте)

взаимодействующих с другими молекулами. При потреблении энергии конформационные переходы теряют обратимость и становятся упорядоченными; перемещение обретает направленность и белок совершает полезную работу [438]. Он может, например, "пройти" вдоль тонкой нити филамента, микротрубочки или двойной спирали ДНК. Такими аллостерическими "шагающими" белками, использующими энергию гидролиза АТР, являются ДНК-геликаза, участвующая в репликации ДНК, кинезин и дайнеин, обеспечивающие внутриклеточную подвижность, и мышечный белок миозин, структуре и функциям которого в основном посвящен этот раздел.

Миозин является белком многих качеств. В сокращении скелетных, сердечных и гладких мышц и во внутриклеточных движениях он одновременно выполняет, по крайней мере, три ключевых функции – структурную, аллостерическую и ферментативную. Наиболее полезная информация о функциях миозина была получена при исследовании поперечнополосатых скелетных мышц, сокращающихся произвольно, а также аналогичных тканей беспозвоночных, прежде всего летательных мышц насекомых. Электронно-микроскопическое изучение продольных и поперечных тонких срезов скелетных мышц, впервые проведенное в 1953 г. Х. Хаксли, выявило высокий уровень их структурной организации [439]. Уже в следующем году Х. Хаксли вместе с Дж. Хенсоном предложили так называемую модель скользящих нитей, которая имела основополагающее значение для понимания природы и молекулярного механизма мышечных сокращений [440]. Скелетные мышцы – это пучки мышечных волокон, наиболее крупным повторяющимся структурным элементом которых является миофибрилла – цилиндрическая нить диаметра 1–2 мкм (1000–2000 Å), идущая от одного конца клетки до другого. Миофибрилла, в свою очередь, содержит белковые филаменты двух типов: толстые и тонкие. Основной белок толстых нитей – миозин, тонких – актин. Миозиновые и актиновые филаменты в миофибрилле строго упорядочены. Функциональной сократительной единицей миофибриллы является саркомера, имеющая длину около 2,5 мкм и разделяющаяся на I- и А-диски (рис. 1.31). Толстые филаменты (длина ~ 1,6 мкм и толщина 0,015 мкм) тянутся от одного края А-диска до другого, а тонкие (длина ~ 1,0 мкм и толщина 0,008 мкм) идут от

Z-линии и заходят в промежутки между толстыми филаментами А-диска. При мышечном сокращении каждая саркомера укорачивается пропорционально всей мышце, причем сжимается только I-диск, а плотный А-диск не изменяет своих размеров. Суть модели скольжения филаментов, предложенной Хаксли и Хенсенom, в том, что сокращение миофибриллы, а следовательно, и мышечного волокна происходит в результате скольжения толстых филаментов относительно тонких при сохранении длин тех и других.

Модель скольжения нитей прошла длительную опытную проверку и наиболее убедительно была подтверждена данными прямых методов электронной микроскопии и рентгеноструктурного анализа. Они показали, что укорочение мышцы действительно не сопровождается изменениями собственных длин филаментов и характера их упаковки в саркомере. Развиваемая мышцей сила оказалась пропорциональной степени взаимного перекрывания миозиновых и актиновых нитей и тем самым обусловленной их взаимодействиями на всем перекрывающемся участке. С появлением электронной микроскопии высокого разрешения (вторая половина 1960-х годов; 20–40 Å) удалось увидеть множество боковых отростков, образующих поперечные мостики между толстыми филаментами и расположенными на расстоянии $\sim 0,013$ мкм (~ 130 Å) от них тонкими филаментами. Стало очевидно, что относительное перемещение нитей совершается с помощью этих мостиков. Они принадлежат миозину и работают, используя энергию гидролиза АТФ, подобно миниатюрным веслам. О том, что АТФ присутствует в мышечных волокнах, было известно с 1929 г., поскольку именно из мышц он был впервые выделен К. Ломаном. То, что миозин катализирует гидролиз АТФ, т.е. является АТФазой, установили В.А. Энгельгардт и М.Н. Любимова в 1939 г. [441]. Это открытие явилось прямым указанием на источник энергии для сокращения мышц и роль миозина в использовании энергии.

К началу 1970-х годов феноменологическая стадия исследования функционирования мышц была в основном завершена; стали известны общая схема процесса, его основные участники и источник энергии [442–445]. Дальнейшее изучение заключалось в поиске ответов на вопросы о том, каков молекулярный механизм сокращения мышц, как на молекулярном уровне совершается трансформация химической энергии гидролиза АТФ в механическую работу и каким образом нервный импульс приводит в движение мышечные волокна. Содержание процесса, спонтанно протекающего в клетке или организме и, следовательно, сопровождаемого понижением свободной энергии, есть не что иное, как реализация потенциальных возможностей участвующих в нем молекул. Поэтому, какой бы ни был выбран подход к решению вопросов, связанных с механизмом работы биосистемы, он непременно должен включать изучение структурной и структурно-функциональной организации взаимодействующих молекул; в случае молекулярного механизма сокращения мышц – организации прежде всего молекул актина и миозина, главных белковых компонентов миофибриллы, а также актино-миозиновых макромолекулярных комплексов. Изучение начинается с

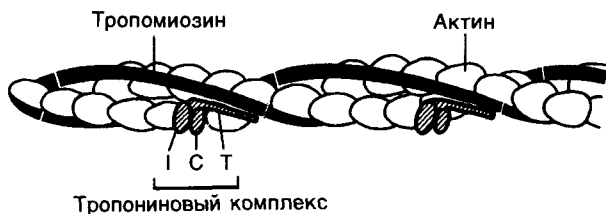
экспериментальных структурных исследований методами электронной микроскопии, особенно криоэлектронной микроскопии, которая при благоприятных условиях может привести к разрешению на атомном уровне, рентгеновской дифракции ориентированных волокон и рентгеновской кристаллографии [446, 447]. В последнее время (1990-е годы) постепенно входит в практику комбинированный подход, использующий результаты как электронной микроскопии, так и рентгеноструктурного анализа для построения согласующихся с данными двух методов атомных моделей трехмерных структур белковых молекул [448]. Подход уже нашел применение в исследованиях мышечных белков и сферических вирусов [449–451].

Для понимания молекулярного процесса знание трехмерных структур вступающих во взаимодействие белков, безусловно, является необходимым условием. Однако изучение процесса можно считать завершенным только в том случае, если он получает полностью априорную трактовку, опирающуюся исключительно на информацию о свойствах молекул в исходном (нативном) состоянии, т.е. трактовку, получаемую при использовании подхода "от структуры к функции". Конкретно это означает возможность строго количественного описания взаимодействий соответствующих белковых структур в виде самопроизвольно протекающего, взаимообусловленного на всех своих стадиях непрерывного процесса. Если попытаться кратко охарактеризовать сегодняшнее состояние исследований механизма мышечных сокращений, то, по-видимому, можно сказать, что они достигли уровня, необходимого для понимания общей схемы процесса, но еще далеки от уровня, достаточного для доказательного объяснения многих его деталей и побудительных мотивов.

Структура актиновых нитей. В состав тонких филаментов входят белки: актин, составляющий, как уже отмечалось, основу нитей, тропомиозин и тропонин. Стандартная процедура выделения актина заключается в экстракции высушенной и измельченной мышечной ткани разбавленным солевым раствором. Такая обработка расщепляет актиновые филаменты на глобулярные субъединицы, каждая из которых образована одной полипептидной цепью с молек. массой 41,8 кДа; это глобулярный актин или G-актин. С каждой молекулой G-актина связан один ион Ca^{2+} , стабилизирующий ее глобулярную конформацию. Кроме того, с G-актином невалентно ассоциирована одна молекула АТФ. При невалентной полимеризации глобулярного актина концевой фосфат АТФ отщепляется и образуется фибриллярный актин или F-актин. Полимеризацию можно вызвать повышением концентрации соли до уровня, близкого к физиологическому. Процесс не требует затраты энергии, хотя и сопровождается гидролизом АТФ, который значительно повышает скорость полимеризации и оказывает влияние на его динамику. По данным электронной микроскопии актиновые филаменты состоят из двух цепей глобулярных молекул, длина которых равна $\sim 65 \text{ \AA}$, а толщина в самой широкой части $\sim 40 \text{ \AA}$. Цепи F-актина образуют двойную спираль, имеющую 13 молекул в шести витках, повторяющихся каждые $360 \text{ \AA}$ [452].

После многолетних попыток удалось закристаллизовать молекулы G-актина, причем только вместе с молекулами ДНКазы I в соотношении 1:1. Поэтому трехмерная структура мономерного актина на атомном уровне стала известна из данных рентгеновской кристаллографии комплекса G-актин–ДНКазы I [453]. Одновременно была получена диаграмма рентгеновского рассеяния F-актинового волокна с разрешением 6 Å и найдена ориентация G-актинового мономера в двойной спирали полимера путем сравнения рассчитанных картин рентгеновской дифракции с наблюдаемой [452]. Оставшиеся неустраненными различия отражают тот факт, что полимеризация актина сопровождается незначительными конформационными изменениями. Но лишь отчасти, поскольку использование уточненной структурной модели G-актина в построении модели F-актиновой нити привело недавно к лучшему совпадению результатов расчета с экспериментальными данными [454]. Дальнейшее уточнение модели затруднено отсутствием для F-актина диаграммы рентгеновской дифракции более высокого, чем 6 Å, разрешения. Выход может быть найден при обращении к теоретическому подходу и использованию методов конформационного анализа и молекулярной динамики [455, 456]. Атомная модель F-актина, построенная путем согласования данных рентгеноструктурного анализа кристаллов G-актина и тонких филаментов F-актина, совпала с атомной моделью, реконструированной по снимкам криоэлектронной микроскопии актиновой нити [457, 458].

С каждым актиновым филаментом тесно ассоциированы два вспомогательных белка, тропомиозин и тропонин, главная функция которых заключается в регуляции мышечных сокращений в зависимости от концентрации ионов Ca^{2+} и, следовательно, нервных импульсов. Жесткие палочковидные α -спиральные молекулы тропомиозина длиной ~ 400 Å лежат в продольных бороздках, тянущихся вдоль актинового филамента, придавая тем самым двойной спирали F-актина необходимую жесткость (рис. 1.32). Глобулярная форма тропонина построена из трех разных субъединиц (тропонины Т, I и С). Тропонин Т имеет участок для связывания тропомиозина и ответственен за прикрепление всего комплекса к актиновому филаменту. При добавлении тропонина I к тропонину Т и тропомиозину образуется комплекс, препятствующий взаимодействию актина с миозином даже в присутствии ионов Ca^{2+} . При наличии тропонина С этот комплекс продолжает



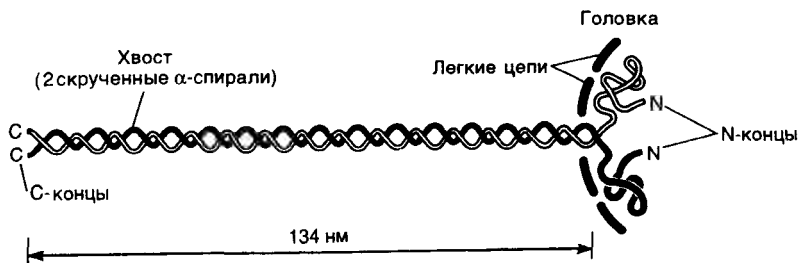
Р и с. 1.32. Схематическое изображение тонкого филамента скелетной мышцы

блокировать взаимодействие миозина с актином, но только в отсутствие Ca^{2+} . При появлении в среде свободного кальция тропонин С связывает четыре иона Ca^{2+} и в таком состоянии снимает блокаду. Именно этот эффект и лежит в основе возбуждения мышечного сокращения ионами кальция. К вопросу о том, каким образом тропомиозин и тропонин контролируют взаимодействие миозина с актином, вернемся после рассмотрения структурной организации толстых филаментов.

Структура миозиновых нитей. Содержание миозина, актина, тропомиозина и тропонина в миофибриллах составляет примерно 55, 25, 15 и 5% соответственно. Отличительная черта миозина скелетных мышц заключается в его способности спонтанно образовывать в условиях *in vitro* гигантские полимерные комплексы, намного превосходящие агрегаты миозина немышечных тканей. Из скелетных мышц миозин извлекается концентрированными солевыми растворами, в которых он хорошо растворим. Обработанная таким образом мышца теряет только толстые филаменты, которые распадаются на составляющие их молекулы миозина, имеющего молек. массу ~ 520 кДа. При обработке концентрированным раствором мочевины или другим детергентом молекула миозина распадается на шесть полипептидных цепей: две идентичные тяжелые цепи с молекулярной массой ~ 220 и две пары легких цепей с молекулярной массой ~ 22 и ~ 15 кДа [459–461]. Как впервые с помощью электронной микроскопии установил в 1963 г. Х. Хаксли, миозин состоит из двух глобулярных "головок", каждая из которых прикреплена к тяжелой цепи, содержащей длинный участок α -спирали [462]. В нативной молекуле миозина α -спирали двух тяжелых цепей закручены одна вокруг другой в суперспираль, образующую палочковидный хвост, из которого выступают две головки. Каждая головка образована глобулярной частью тяжелой цепи (~ 95 кДа) и включает по одной молекуле легкой цепи двух видов (рис. I.33).

Толстые филаменты образуются путем ассоциации молекул миозина за счет их палочковидных хвостов: несколько сотен молекул, располагаясь параллельно со сдвигом по длине, формируют пучок, из которого выступают латерально расположенные миозиновые головки (рис. I.34). Вся структура биполярна. Выступающие головки отсутствуют лишь на небольшом срединном участке филамента, где соединяются два противоположно направленных пучка миозиновых хвостов. Глобулярные головки миозиновых молекул взаимодействуют с актином и образуют поперечные мостики между толстыми и тонкими филаментами.

Протеолиз тяжелых филаментов показал, что миозиновая головка легко отделяется от остальной части белка, образуя так называемый субфрагмент I (SI) и суперспиральный стержень, ответственный за самосборку миозина и создание структурной основы толстых нитей [459, 464]. Субфрагмент I содержит нуклеотидсвязывающий активный центр для АТФ, актинсвязывающую поверхность и две области контактов с легкими цепями. Таким образом, глобулярная головка и вне филамента сохраняет все свои функции. Входящие в нее легкие цепи отличаются



Р и с. I.33. Схема построения молекулы миозина



Р и с. I.34. Схематическое изображение толстого филамента скелетной мышцы [463]

друг от друга по структуре и свойствам. В некоторых видах миозина они не оказывают заметного влияния на АТРазную активность фермента [465]. Однако в других видах миозина легкие цепи его головки могут участвовать в регуляции гидролиза АТФ, но только в присутствии актина [466, 467].

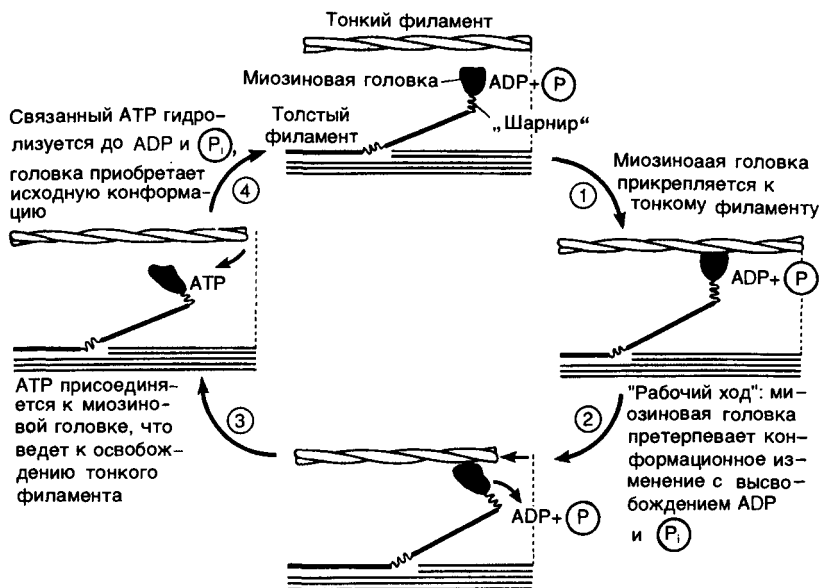
Миозин является объектом всестороннего изучения практически на протяжении всего XX столетия. Еще в исследованиях А.Я. Данилевского в конце прошлого века отмечалось, что миозин обладает двойным лучепреломлением. Однако до самого последнего времени все знания о пространственной структуре ограничивались информацией о внешнем очертании молекулы и ее габаритных размерах, полученных с помощью электронной микроскопии. В частности, было известно, что миозиновая головка имеет грушевидную форму $\sim 190 \text{ \AA}$ в длину и $50 \text{ \AA}$ в ширину, а двойная спираль хвостового участка соответственно ~ 1500 и $\sim 20 \text{ \AA}$ [468–471]. Последние три десятилетия камнем преткновения в определении трехмерной структуры миозина, как и структуры актина, было получение качественных кристаллов белка для рентгеноструктурного анализа. И. Рейменту и соавт. удалось получить требуемые кристаллы, используя не совсем обычный в белковой кристаллографии прием – N-метилирование боковых цепей всех остатков Lys миозинового фрагмента I в мягких условиях [472]. Для того чтобы убедиться в том, что метилирование не привело к радикальному изменению конформационных и ферментативных свойств белка, авторы подвергли подобной химической модификации лизоцим и не обнаружили после этой процедуры существенных нарушений в трехмерной структуре фермента. Кроме того, были проверены кинетические свойства метилированного миозина SI [473]. Он сохранял каталитическую активность, хотя и наблюдались отклоне-

ния кинетических параметров гидролиза АТР от их значений у нативного образца.

Трехмерная структура субфрагмента I миозина была идентифицирована Рейментом и соавт. с помощью рентгеноструктурного анализа с разрешением 2,8 Å [471, 472, 474]. В результате были не только уточнены внешние размеры миозиновой головки, которые подтвердили, что она лишена симметрии и имеет в длину 165 Å, а в утолщенном месте 65×40 Å, но и построена атомная модель из 1072 аминокислотных остатков (из общего количества 1157). Структура содержит много α -спиралей (~ 48%), из которых самая длинная простирается на 85 Å от утолщенного места в направлении С-конца тяжелой цепи SI. Большую часть этой спирали обволакивают легкие цепи, ELC (essential light chain) и RLC (regulatory light chain), свидетельствуя тем самым о том, что одно из основных назначений этих цепей заключается в конформационной стабилизации тяжелой цепи миозиновой головки. Во всяком случае, при удалении, например, RLC структура SI разрушается [475]. Помимо этого, легкие цепи способствуют конформационным перестройкам, происходящим при связывании и освобождении нуклеотида в утолщенной части головки. Для того чтобы облегчить описание трехмерной структуры субфрагмента I, его тяжелую цепь целесообразно разделить на три части: N-концевую, включающую остатки Asp-4—Glu-204, центральную Gly-216—Tyr-626 и С-концевую Gln-647—Lys-843. Между ними находятся лишённые вторичных структур петли, которые легко поддаются триптическому расщеплению, образуя фрагменты тяжелой цепи с молек. массами 25, 50 и 20 кДа.

Утолщенная часть миозиновой головки содержит нуклеотидный и актиновый центры связывания и, таким образом, имеет все необходимые для генерации движения компоненты. Непосредственно двигательная, моторная часть миозина представляет собой комплекс вторичных структур, расположенных вокруг β -слоя, состоящего из семи, в основном параллельных, β -тяжей. В нее входят компоненты всех трех расщепляемых трипсином фрагментов тяжелой цепи. Нуклеотидсвязывающий пакет локализован на конце центрального β -складчатого листа и примыкает с одной стороны к фрагменту 25 кДа, а с другой к фрагменту 50 кДа. Локализация аминокислотных остатков, формирующих нуклеотидный активный центр миозина, определена с помощью метода меченых атомов [476] и по аналогии с последовательностями фосфатных петель в структурах аденилаткиназы и РНКазы [477, 478]. Связывающий пакет имеет глубину ~ 13 Å и приблизительно такую же ширину. Поскольку кристаллы были выращены в отсутствие АТР, то в найденной структуре миозинового субфрагмента I активный центр отвечает открытой конформации.

Взаимосвязь гидролиза АТР с мышечным сокращением, обнаруженная, как отмечалось, еще в 1939 г., рассматривалась в большой серии кинетических исследований. Результаты, полученные впервые Р. Лимном и Е. Тейлором в 1971 г., а также другими авторами в последующие годы, не претерпели принципиальных изменений и приводят к одному и тому же представлению об актин-миозиновом



Р и с. I.35. Схема механизма использования энергии гидролиза АТФ для передвижения актинового филамента относительно миозина

механизме сокращения мышц [471, 479–482]. Он показан на рис. I.35 и соответствует четырехтактному процессу перехода энергии гидролиза АТФ в механическую работу. На первом этапе предполагаемого механизма миозиновая головка, несущая продукты гидролиза АТФ (АДФ и P_i), прикрепляется к актиновому филаменту. Второй этап ("рабочий ход") начинается с изменения конформации головки, вызванного ее взаимодействием с актином, что приводит к освобождению продуктов гидролиза и возникновению в актомиозиновом комплексе напряженности, разрезающей при продольном перемещении тонкого филамента. По завершении движения возникают условия для присоединения к миозиновой головке новой молекулы АТФ, что сопровождается разрушением актин-миозиновых контактов (этап 3). Цикл заканчивается гидролизом АТФ и изменением конформации головки, которая принимает первоначальное положение. Предполагается, что каждая головка молекулы миозина проходит свой цикл независимо.

Таким образом, наиболее существенные черты механизма действия актомиозинового комплекса заключаются в том, что, во-первых, реакция гидролиза АТФ совершается в то время, когда миозин не взаимодействует с актином, и, во-вторых, движущая сила процесса возникает при освобождении продуктов АДФ и γ -фосфата. С описанным представлением о том, как миозиновые головки "шагают" вдоль актиновых филаментов, согласуются не только результаты кинетических исследований, но и множество экспериментальных данных,

полученных с использованием других методов. В частности, общепринятое представление подтверждают ставшие недавно известными трехмерные структуры мономерного актина [452, 453] и миозиновой головки [471, 472], а также построенная на их основе с привлечением данных криоэлектронной микроскопии структурная модель актомиозинового комплекса с разрешением 5–8 Å [474]. Одна из ключевых особенностей этого комплекса, ставшая очевидной после создания модели, заключается в существовании невалентных контактов между актином и С-концевым доменом триптического фрагмента 50 кДа. Взаимодействия такого вида могут стимулировать конформационные изменения миозина в момент его сближения с актином на втором этапе процесса сокращения мышцы (рис. 1.35). Недавно при изучении скелетных мышц методом малоуглового рентгеновского рассеяния были получены данные, убедительно свидетельствующие о существенном изменении шейпа миозиновой головки при нуклеотидном связывании [483].

Конформационная перестройка миозина сопровождается аллостерическим эффектом – смыканием длинной узкой щели, находящейся на границе между толстой и тонкой половинами грушевидной головки. Результатом становятся сближение актина с нуклеотидным центром миозина и высвобождение ADP и неорганического фосфата. В этом причина того, почему миозин представляет собой актин-зависимую АТРазу. Давно было замечено, что этапом, лимитирующим скорость каталитической реакции, является не связывание молекул АТФ в активном центре и не собственно гидролиз, а освобождение продуктов ферментативной реакции, остающихся прочно связанными с миозином, что и препятствует началу следующего каталитического акта [442, 443]. АТРазная активность очищенного миозина невелика: для гидролиза одной молекулы АТФ ферменту требуется ~ 30 с. В присутствии актина каждая молекула миозина способна гидролизовать от 5 до 10 молекул АТФ в секунду.

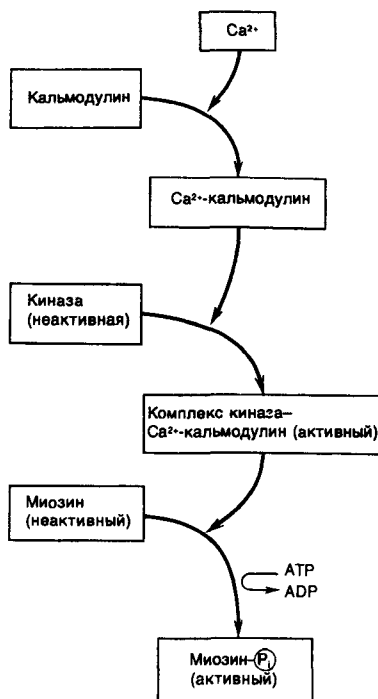
Толстый филамент содержит ~ 500 миозиновых головок и все они работают одновременно, но не синхронно, втягивая актиновую нить. В новом цикле взаимодействия с актином головка присоединяется к другому мономеру тонкого филамента, расположенному ближе к Z-пластинке. Предельное сокращение мышцы развивается в сотые доли секунды (~ 0,02 с). Покоящаяся мышца эластична и легко растягивается. Сокращенная мышца, наоборот, неэластична, ригидна; растяжению препятствуют связи между актиновыми и миозиновыми нитями, сохраняющиеся при недостаточной концентрации АТФ.

Сокращение скелетной мышцы контролируется волей, проявляющейся при включении потенциала действия нервного волокна и получении сигнала от соответствующего мотонейрона. Электрическое возбуждение быстро распространяется по так называемым Т-трубочкам, которые окружают каждую миофибриллу в области Z-пластинок. Здесь электрический сигнал передается на саркоплазматический ретикулум – систему разветвленных, сообщающихся между собой пузырьков. В момент активации электрическим импульсом, прошедшим

Р и с. 1.36. Схема реакций, индуцирующих сокращение гладких мышц в присутствии Ca^{2+}

Киназа — фермент, катализирующий сайт-специфическое фосфорилирование легкой цепи миозина

по Т-трубочкам, саркоплазматический ретикулум выбрасывает в цитозоль большие количества ионов Ca^{2+} , что посредством вспомогательных мышечных белков поддерживает нужное расположение активных миозиновых филаментов и тем самым инициирует сокращение миофибрилл. В гладких мышцах изменение концентрации ионов Ca^{2+} , помимо влияния гормонов, определяется также Са-связывающим белком — кальмодулином. В комплексе с Ca^{2+} он активирует киназу легких цепей миозина. Образовавшийся тройной комплекс индуцирует каскад реакций сокращения мышц (рис. 1.36). Сигнал от мембраны мышечной клетки



через Т-трубочки и саркоплазматический ретикулум доходит до саркомеры за несколько миллисекунд, поэтому все миофибриллы мышечной клетки сокращаются практически одновременно. Связь мышечного сокращения с изменениями концентрации Ca^{2+} обусловлена функциями вспомогательных белков тропомиозина и тропонина, ассоциированных с актиновыми филаментами (рис. 1.32). Они участвуют в регуляции мышечного сокращения ионами Ca^{2+} и тем самым делают АТФ-зависимую активность миозина чувствительной к концентрации этих ионов.

Предполагается, что тропомиозин и тропонин осуществляют Ca^{2+} -зависимую регуляцию мышечного сокращения стерическим препятствованием взаимным контактам актина и миозина. При повышении концентрации ионов Ca^{2+} молекулы тропомиозина изменяют свое положение, быть может, благодаря изменению формы связанных с ним молекул тропонина, прежде всего тропонина С. В отсутствие Ca^{2+} тропомиозин, тропонин Т и тропонин I образуют комплекс, препятствующий взаимодействию актина с миозином. При появлении ионов кальция тропонин С связывает четыре иона Ca^{2+} и в таком состоянии снимает блокаду и дает возможность головкам миозина вступить во взаимодействие с актином [484].

Установление атомных трехмерных структур белков G-актина и миозинового субфрагмента I и воссоздание на этой основе с привлечением электронной микроскопии и малоуглового рентгеновского

рассеяния пространственного строения тонкого и толстого филаментов означает почти полную визуализацию элементарной составляющей саркомы, способной демонстрировать принципы сокращения скелетных мышц и конкретный конформационно-электронный механизм трансформации химической энергии в механическую работу. Разработка атомно-молекулярной модели актомиозинового комплекса явилась одним из выдающихся достижений молекулярной биологии последних лет как в методологическом, так и в чисто научном отношении. В методологическом плане ее создание проиллюстрировало максимальные на сегодняшний день возможности эмпирического подхода, прежде всего рентгеноструктурного анализа и электронной микроскопии, а также эффективность их совместного использования в изучении пространственного строения сложных белковых ассоциатов. Научная значимость предложенной модели мышечного сокращения определялась тем, что она, во-первых, отвечала наивысшему уровню современного познания молекулярной структурной организации биологической системы и глубокому проникновению в механизм ее функционирования, а во-вторых, обладала огромной потенцией, раскрытие которой может в будущем привести к первому в истории биологии априорному количественному описанию сложного физиологического процесса, исходя только из знания структурно-функциональной организации участвующих в нем молекул. В настоящее время подобного описания механизма действия не имеют даже несравненно более простые системы.

Появление предложенной И. Рейментом и Х. Холденом атомно-молекулярной модели актомиозинового комплекса явилось неординарным событием в современной молекулярной биологии, поскольку свидетельствовало, что в силу различных причин (быть может, из-за меньшей сложности) изучение функционирования мышечной системы могло опередить исследования, в принципе аналогичного плана и той же цели, других молекулярных биосистем, функционирование которых сопряжено с трансформацией разных видов энергии [471]. Поэтому прослеживание пути, приведшего к созданию модели актомиозинового молекулярного мотора, может иметь значение, выходящее за пределы механики сокращений скелетных мышц. Речь идет не только (и не столько) об использовании накопленного опыта и полученных результатов в исследовании близкородственных скелетной мускулатуре видов мышечной ткани сердечной и гладкой мускулатуры, функционирующих непроизвольно, или в исследовании жгутиков бактерий и ресничек инфузорий, а также некоторых клеток животных и растений. Экстенсивное развитие этой области очевидно и не требует особых комментариев. Не будем подробно распространяться и о расширившихся в последние годы возможностях в экспериментальном исследовании процесса мышечных сокращений [485]. Отметим лишь, что наиболее заметным событием здесь явилось привлечение хорошо дополняющих рентгеноструктурный анализ и электронную микроскопию методов молекулярной генетики и метода "лазерной ловушки" [486, 487]. Последний позволяет наблюдать за перемещениями

единичных белков в 100–200 Å и измерять силу их взаимодействий до 7 пН ($7 \cdot 10^{-7}$ дин). Ниже речь пойдет о дальнейшем совершенствовании самой модели, о проблеме перехода от феноменологического описания механизма действия молекулярного мышечного мотора к созданию строгой теории сокращения мышц и количественного метода анализа этого процесса.

При создании своей модели Реймент и Холден обобщили данные не только собственных работ [471, 472, 474]. Модель явилась результатом синтеза и логического завершения цикла многочисленных исследований последних четырех десятилетий, прежде всего исследований 1990-х годов, G- и F-актина с помощью рентгеноструктурного анализа и криоэлектронной микроскопии [452, 453, 457, 485]. Все они имели единую направленность поиска (от сложного к простому) и единый подход к познанию (от функции к структуре). Модель Реймента и Холдена завершила путь, основные этапы которого отражены в следующей схеме: скелетная мышца → мышечное волокно → миофибрилла → саркомер → актиновые и миозиновые филаменты → белковые компоненты.

В принципе такой же строго последовательный, ступенчатый переход в направлении от системы с более сложной структурной организацией к менее сложной присущ исследованиям любых биологических систем. Он неизбежен, поскольку живая природа организована таким образом, что каждая целостная биосистема (в нашем случае опорно-двигательная), расположенная в соответствии с конструкционным рангом (например, от цитоскелета до отдельных белков), представляет собой набор взаимодействующих между собой иерархически упорядоченных дискретных структур, каждая из которых является подсистемой по отношению к восходящей ветви ряда и системой по отношению к нисходящей ветви. Если это так и биосистемы действительно обладают субординационной организацией и построены по единой принципиальной схеме, подобной приведенной выше, то, несмотря на структурную и функциональную специфику каждой биологической системы, их изучение также должно строиться по единому принципиальному плану и иметь гносеологическую общность. Нет сомнения в том, что путь от отдельного органа до отдельных молекул через все соединяющие их ступени иерархической лестницы, который прошли и в значительной мере уже завершили при исследовании мышечных сокращений, должны пройти и при исследовании других биосистем. Поэтому представляет интерес проследить за ходом изучения актомиозинового комплекса с самой общей позиции, выделить особенности пройденного пути, не связанные с конкретными объектами исследования, оценить возможности созданной атомно-молекулярной модели, характер решаемых и не решаемых ею задач и, наконец, спрогнозировать ситуацию, возникающую после создания модели функционирования биосистемы. Иными словами, желательно получить ответы на вопросы, касающиеся, во-первых, общих для исследований всех биосистем особенностей и направленности поиска, во-вторых, возможностей и ограничений принципиального порядка, присущих

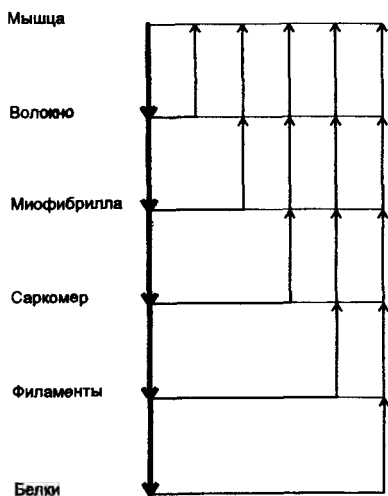
моделям механизмов действия биосистем молекулярного уровня и, в-третьих, ближайших перспектив исследований биосистем, трехмерные структуры которых известны.

Общая черта исследований различных биосистем, отражающая природу их субординационной структурной организации, заключается в том, что во всех случаях изучение объекта представляет собой последовательный ступенчатый процесс познания, развитие которого ориентировано от более сложной биосистемы к менее сложной. Здесь и ниже имеется в виду не перечень открытий в их временной последовательности, а каузальный, т.е. причиннообусловленный процесс познания, что не всегда совпадает. Другая черта, также являющаяся общей, состоит в том, что изучение биосистемы любого уровня организации начинается с анализа ее внешней формы и строения, т.е. морфологии. В случае скелетной мышцы сначала было выяснено, что она состоит из пучка мышечных волокон, а каждое волокно представляет собой огромную многоядерную клетку. Эти данные сами по себе еще ничего не говорят о мышечном сокращении, тем более его механизме. Однако последующая редукция системы и изучение морфологии составных частей волокна привели к обнаружению миофибрилл и открытию у них способности сокращаться в присутствии АТР. Стало очевидно, что миофибриллы, составляющие около двух третей массы волокна, являются сократительными элементами клеток мышечной мускулатуры. Почему сокращается сама миофибрилла, осталось пока неясно, но была объяснена причина сокращения мышечного волокна. Морфологическое изучение миофибриллы идентифицировало ее сократительную единицу – саркомер. Сам факт его обнаружения хотя и не прояснил природу сокращения, тем не менее, дал первую информацию о физиологии миофибриллы и детализировал представления о мышечном сокращении на более высоких уровнях волокна и скелетной мускулатуры. Вскоре стало известно, что сокращение саркомера есть результат скольжения толстых филаментов относительно тонких при сохранении длин тех и других. Морфологическое изучение саркомера вызвало появление первой физиологической модели мышечного сокращения (модели скользящих нитей). Она дала трактовку механизму сокращения саркомера, миофибриллы, волокна и скелетной мышцы, но не могла объяснить причину скольжения филаментов.

Знакомство с морфологией филаментов, осуществленное главным образом с помощью электронной микроскопии и малоуглового рентгеновского рассеяния, позволило предположить, что ответственными за связывание с актиновыми филаментами являются глобулярные головки миозина, прикрепленные к его фибриллярному хвосту. Возникла мысль, что миозиновая головка, используя энергию гидролиза АТР, изменяет свою конформацию и тем самым образует молекулярный рычаг, с помощью которого создается тянущее усилие по отношению к тонкому филаменту. На этой основе в конце 1960-х годов была предложена гипотетическая схема АТРзависимого циклического механизма мышечного сокращения, которая согласовывалась с

множеством имеющихся экспериментальных данных. Схема объясняла причину смещения филаментов друг относительно друга и, следовательно, сокращение саркомера, миофибриллы, волокна и скелетной мышцы. Предполагалось, что протекание по этой схеме четырехтактного цикла облегчается вспомогательными мышечными белками, одни из которых поддерживают нужное пространственное расположение актиновых и миозиновых филаментов, а другие участвуют в регуляции сокращения скелетной мышцы ионами кальция.

В течение последующих более чем двух десятилетий, вплоть до 1990-х годов, предложенное объяснение механизма мышечного сокращения, несмотря на продолжающееся все это время изучение цитоскелета, не претерпело значительного изменения и не смогло обрести доказательной силы. В чем же причины быстрого развития этой области в 1950–1960-е годы, отсутствие заметного прогресса в 1970–1980-е и всплеск достижений в первой половине 1990-х годов? Приведенное выше краткое описание основных этапов развития исследований скелетных мышц как будто бы неоспоримо свидетельствует о наличии прямой связи темпа и глубины познания с достижениями в изучении морфологии, точнее, с временем прохождения исследований от внешней формы и строения биосистемы и далее через все уровни ее структурной организации, от вышестоящей, более сложной, к ближайшей нижестоящей, менее сложной. В 1950–1960-е годы имел место прогресс в изучении морфологии – разработаны модель скользящих нитей, молекулярная модель актомиозинового комплекса и схема молекулярного механизма относительного перемещения толстых и тонких филаментов. В 1970–1980-е годы отсутствовал прогресс в изучении морфологии, не было качественного развития представления о работе скелетных мышц. В начале 1990-х годов удалось закристаллизовать G-актин и глобулярную головку миозина и с помощью рентгеноструктурного анализа идентифицировать их атомные трехмерные структуры. Приблизительно в это же время была расшифрована дифракционная картина малоуглового рентгеновского рассеяния актомиозинового комплекса, а также получены его крио-электронные микрофотографии высокого разрешения. Последствиями морфологических достижений явились создание атомно-молекулярной модели мышечного сокращения, определение местоположения и геометрии АТФ-связывающего активного центра и области миозина, периодически контактирующей с актином и обуславливающей относительное перемещение нитей, уточнение мест локализации на тонком филаменте тропомиозина и тропонинового комплекса и их роли в реализации и регуляции АТФ-зависимого механизма мышечного сокращения. Сказанное выше о связи между знанием строения мышечной системы и пониманием механизма ее действия, т.е. между морфологией различных уровней структурной организации и физиологией мышцы, иллюстрирует схема, приведенная на рис. 1.37. Жирные стрелки указывают направление строго последовательного ступенчатого процесса познания структуры, а противоположно ориентированные тонкие стрелки – процесса познания функции биосистемы.



Р и с. 1.37. Схема подхода "от сложного к простому", иллюстрирующая на примере скелетной мышцы обусловленность физиологических исследований вышестоящей подсистемы (тонкие стрелки, направленные вверх) знанием морфологии нижестоящей подсистемы (толстые стрелки, направленные вниз)

Очевидно, что чем полнее и детальнее информация о форме и составе простейших подсистем, тем глубже понимание механизма функционирования всей системы. Такой характер взаимообусловленности глубины проникновения в сущность физиологического явления от знания морфологии его участников является общей чертой необратимых процессов познания всех биологических систем. Трактовка свойств биологической системы всегда относительна и основывается на информации о структуре нижестоящих подсистем.

Высказанные соображения о наличии общих особенностей и единого принципиального плана развития исследований биосистем, несмотря на их, быть может, самоочевидность, ведут к нетривиальным заключениям, представляющим особую актуальность в настоящее время. Развитие биологии в течение всей истории определялось двумя встречными потоками исследований – морфологическим, направленным от сложноорганизованных объектов и явлений к более простым, и физиологическим, имеющим противоположную направленность. Ведущим всегда являлся первый поток, а ведомым – второй. В начале второй половины XX в. биология в своем движении от сложного к простому, обусловленном достижениями в морфологии, дошла до самого универсального и простейшего уровня биосистем – своего молекулярного "дна". Развитие в том же плане (от морфологии к физиологии) и в том же направлении (от сложного к простому) становится невозможным. Привычный источник получения качественно новой информации иссяк, поскольку морфологические данные о мыслимых нижестоящих подсистемах (отдельных аминокислот, атомных групп, атомов) не содержат биологической специфики и, следовательно, прямо не связаны с функцией любой рассматриваемой биосистемы.

Таким образом, используемый биологией подход завершается установлением с помощью рентгеноструктурного анализа, электронной

микроскопии или иного экспериментального метода трехмерных структур белков. На основе опытных данных о структуре биосистемы молекулярного уровня подтверждаются существовавшие ранее или формируются новые, более детальные и обоснованные представления о механизме функционирования, разрабатывается атомно-молекулярная модель процесса и формируется соответствующая гипотеза. По существу делается все то, что делалось и ранее в отношении сложноорганизованных биосистем при получении новой информации о морфологии нижестоящих подсистем. Например, исследование строения мышечных волокон в свое время дало возможность объяснить сокращение мышц свойствами миофибрилл. Сократимось миофибрилл позднее получила свою трактовку, основывающуюся на свойствах ансамблей толстых и тонких филаментов саркомеров. Сейчас, после установления трехмерных структур актина и миозина и создания модели актомиозинового комплекса, работа мышц объясняется на уровне отдельных молекул. Окончательный итог последнего этапа развития исследований мышечной системы в традиционном направлении может быть в лапидарной форме выражен следующей фразой: мышцы сокращаются потому, что так устроены молекулы белка. Аналогичные заключения имеют все исследования, в которых свойства одних биологических объектов трактуются на основе свойств менее сложных биологических объектов.

При использовании подхода "от сложного к простому" выводы имеют качественный характер и опираются на экспериментальные данные и эмпирические зависимости, как правило, недостаточные и неоднозначно трактуемые. Примером служат рассмотренные в разделе 3.3 аспартатные протеиназы, для которых было предложено четыре различных механизма каталитического акта, в равной мере удовлетворяющих имеющийся экспериментальный материал. Поэтому предлагаемые описания процессов функционирования биосистем всегда (даже когда известны трехмерные структуры взаимодействующих друг с другом белков с атомным разрешением) являются не только качественными, но и гипотетическими.

Если попытаться выделить самую важную роль, которую рентгеноструктурный анализ белков сыграл в эволюции биологии, то, по нашему мнению, она состоит не только в том, что с его помощью началось изучение биосистем на молекулярном уровне, без чего трудно представить становление молекулярной биологии. Выдающиеся достижения метода здесь бесспорны. Для дальнейшего развития биологии, да и всего естествознания, по-видимому, более принципиальным явилось то обстоятельство, что рентгеноструктурный анализ впервые подвел науку о живой природе к изучению простейших биологических объектов, познание которых требует выхода за рамки биологии и привлечения более фундаментальной естественнонаучной основы. Биология, приступив к физико-химическому изучению молекулярной структуры белков и других природных веществ, их взаимодействий и превращений в живых организмах, впервые соприкоснулась на том же элементарном уровне с физико-химическими исследованиями молеку-

лярных структур и явлений неорганического мира. Это событие, главным участником которого был рентгеноструктурный анализ белков, имело огромное значение для естествознания, поскольку возникли условия для получения единой для всех областей знания атомно-молекулярной основы и становления цельной, обобщенной науки, изучающей с общей позиции органический и неорганический мир и их взаимоотношения. Благодаря этому проблема специфики живого и неживого может быть теперь отнесена к строго научной проблеме, решаемой на простейшем и едином для всех объектов и явлений атомно-молекулярном уровне.

Итак, подход к изучению биосистем "от сложного к простому" или "от морфологии к физиологии", единственный в течение целого ряда столетий, стимулировавший и определявший направление развития биологии и приведший во второй половине XX в. науку о живой природе к поражающим воображение достижениям в области структуры и функции низших биосистем, к настоящему моменту, достигнув апогея, в значительной мере исчерпал свой идейный потенциал. Из этого отнюдь не следует, что данный подход стал менее актуален; ему, синтезирующему в себе экспериментальную, эмпирическую и феноменологическую формы научного познания, не грозит отойти в прошлое. Оставаясь по-прежнему необходимым, он начинает терять свою определяющую роль в эволюции биологии, постановке и решении ее принципиально новых проблем. Все ощутимее проявляется его ограниченность, все более становится очевидно, что наличие одних только экспериментальных данных, эмпирических соотношений и феноменологических описаний, как бы многочисленны и уникальны не были первые, безусловно не выглядели вторые и убедительными не казались третьи, недостаточно для качественного продвижения вперед в познании сущности живого. При использовании только существующего подхода и, следовательно, продолжении экстенсивного развития молекулярной биологии путем накопления новых фактов и даже открытий новых явлений разрыв между знанием и пониманием будет иметь тенденцию к увеличению.

Что же требуется для дальнейшего прогресса биологии и ее перехода в следующее, более совершенное качественное состояние? Выше было отмечено, что пути развития исследований всех биосистем в принципе совпадают. Поэтому ответ на поставленный вопрос не потеряет своей значимости и общности, если будет получен при рассмотрении конкретного объекта, например, того же актомиозинового комплекса. Какую же нужно иметь дополнительную информацию (помимо морфологической) о структурах миозина, актина и других белков, чтобы не только составить гипотетическое представление о работе актомиозинового комплекса и взаимодействиях с питающими его энергией молекулами АТФ и регулируемыми его функционирование ионами Ca^{2+} , а пойти дальше и попытаться понять, почему это происходит? Необходимы количественные данные о совершаемых конформационных и химических изменениях, их последовательности, побудительных мотивах и взаимообусловленности. При

известной пространственной структуре актомиозинового комплекса критерием достоверности знания может служить количественное описание механизма его действия как спонтанно протекающего периодического процесса. Главная проблема здесь заключается не столько в объеме и качестве экспериментального материала, сколько в его физико-химическом истолковании, т.е. наличии соответствующих теорий, логически и количественно связывающих между собой аминокислотную последовательность, пространственную структуру и функцию молекулы белка. Как в свое время изучение явлений неживой природы подвело к необходимости разработки теоретической физики, а позднее теоретической химии, так и теперь более глубокое проникновение в мир живого и понимание его закономерностей на самом фундаментальном уровне стали немыслимы без теоретической биологии. Становление теоретической биологии ознаменуется появлением в науке о живой природе нового подхода, рассматриваемого в третьем и четвертом томах настоящего издания. Сейчас лишь отметим, что по своей направленности он ориентирован "от простого к сложному" и, следовательно, альтернативен существующему.

Глава 4

ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ РЕНТГЕНОСТРУКТУРНОГО АНАЛИЗА БЕЛКОВ

Предшествующая глава была посвящена рентгеноструктурным исследованиям белков, научная значимость и новизна которых обусловлены не столько методологическими и техническими достижениями кристаллографии, сколько важностью самих объектов анализа. В ней рассмотрены ставшие впервые известными лишь в 1990-е годы пространственные структуры молекул мембранных рецепторов, иммунных белков Т-лимфоцитов, гистонового октамерного коры нуклеосом, ДНК-топоизомеразы, аспартатных протеиназ ретровирусов и белков актомиозинового комплекса скелетных мышц. Рентгеноструктурный анализ получил широчайшее распространение и в течение более тридцати лет практически безраздельно определяет экстенсивное развитие морфологии биосистем атомно-молекулярного уровня. К настоящему времени с его помощью расшифрованы трехмерные структуры нескольких тысяч белков, полипептидных фрагментов и макромолекулярных комплексов. Вне сомнения, даже при сохранении сегодняшнего состояния рентгеноструктурного анализа изучение пространственного строения белков будет продолжаться в обозримом будущем с возрастающей интенсивностью как в отношении количества, так и сложности исследуемых объектов. Между тем, работы такого плана не дают полного представления о конформационных возможностях белковых молекул и не всегда приводят к объективным заключениям о

механизмах их функционирования. Однозначная интерпретация имеющегося экспериментального материала, в частности, установление обусловленности функций белков структурной организацией их молекул, непременно требует привлечения соответствующих теорий и расчетных методов. Дальнейшее качественное совершенствование представления о структурной и структурно-функциональной организации белков немыслимо без теоретической молекулярной биологии – таков принципиальный итог развития рентгеновской кристаллографии белковых молекул.

При обсуждении рентгеноструктурных исследований в настоящей главе акцент сделан не на конкретных объектах анализа, а на впервые использованных методологических и технических усовершенствованиях, касающихся источников излучения, продолжительности измерений, фазовой проблемы и условий проведения эксперимента. Новшества такого рода представляют особый интерес, поскольку именно они приводят к получению ранее недоступной информации и, следовательно, ведут к интенсивному развитию морфологии белков.

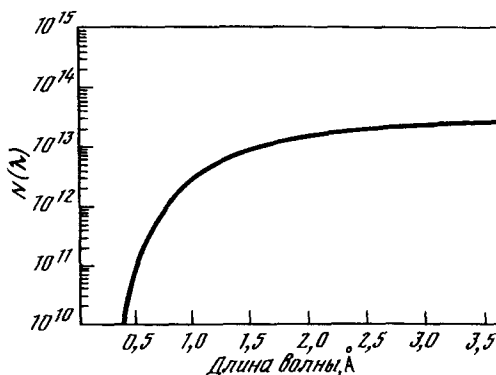
4.1. СИНХРОТРОННОЕ ИЗЛУЧЕНИЕ

Самым существенным методологическим достижением рентгеноструктурного анализа последнего десятилетия, по-видимому, можно считать начавшееся применение в кристаллографии белков синхротронной радиации, значительно более мощной по сравнению с излучением традиционных источников. В первый период становления рентгеноструктурного анализа, 1960–1970-е годы, большинство трехмерных структур белков было расшифровано с использованием запаянных острофокусных трубок с медным анодом, имеющих характеристическую длину волны $\lambda(K_\alpha) \sim 1,54 \text{ \AA}$ и фокусное пятно примерно $8,0 \times 0,4 \text{ мм}$. Интенсивность излучения таких трубок ограничивалась скоростью отвода тепла от анода и при малых кристаллах белков с большими элементарными ячейками не обеспечивала желаемого разрешения. В конце 1970-х годов появились трубки с вращающимся анодом и фокусом $\sim 2,0 \times 0,2 \text{ мм}$. Их яркость, оцениваемая потоком фотонов коллимированного рентгеновского пучка (10^9 – 10^{10} фотонов в с), была в несколько раз выше, чем у лучших запаянных трубок, а фокусировка пучка на заметно меньшую площадь позволяла получать дифракционные картины с более высоким разрешением и меньшей экспозицией. В настоящее время рентгеновские трубки с вращающимся анодом и никелевым или графитовым фильтрами применяются в анализе повсеместно.

В 1959 г. Л. Парратт предложил использовать в кристаллографии в качестве источника рентгеновского излучения синхротрон [488]. Заряженные частицы, двигаясь по кругу в синхротроне с релятивистскими скоростями в однородном магнитном поле, начинают испускать при торможении и искривлении траектории сплошной спектр электромагнитных волн в форме острого конусного пучка с углом

Р и с. 1.38. Зависимость интенсивности излучения $N(\lambda)$ синхротрона в г. Дейрсбэри от длины волны

$N(\lambda)$ — число фотонов/ (с. мрад. Å) в полосе шириной 0,1% для $E=2,0$ ГэВ, $B=1,2$ тесла, $I=1,0$ А и $R=5,5$ м



расхождения $\sim 0,018^\circ$ и осью, совпадающей с мгновенным (тангенциальным) направлением движения. Коротковолновая часть спектра синхротронного (магнитотормозного) излучения (рис. 1.38) имеет широкий максимум в области, представляющей интерес для рентгеноструктурного анализа. Полихроматическая радиация синхротрона, в отличие от традиционных источников, может быть монохроматизирована на значительно большем участке длин волн и, следовательно, дать мощный поток рентгеновских лучей. У электронного синхротрона в г. Дейрсбэри (Великобритания) полезный поток фотонов $N(\lambda)$ по меньшей мере в 10^2 – 10^3 раз более интенсивен, чем у самых совершенных современных рентгеновских трубок с вращающимся медным анодом. Идея Парратта стала предметом серьезных дискуссий, однако, долгое время оставалась нереализованной. Сомнения вызывали как возможность фактического увеличения интенсивности дифракционных пучков, так и способность белковых кристаллов выдерживать интенсивное облучение [489]. Лишь в 1971 г. синхротронная радиация была применена в дифракционных исследованиях биологических объектов. Г. Розенбаум и соавт. [490, 491], изучая рассеяние рентгеновских лучей под малыми углами мышечных волокон, показали, что использованное ими излучение после монохроматизации и фокусировки на два порядка превосходит максимальную интенсивность коллимированного фильтрованного CuK_α -излучения рентгеновской трубки и при этом не разрушает облучаемый объект. Использование синхротронной радиации в методе малоуглового рентгеновского рассеяния было предложено М.А. Мокульским и соавт. [492].

Вопрос о возможности применения синхротронного излучения в рентгеноструктурном анализе белковых монокристаллов впервые был рассмотрен в теоретическом плане Г. Уискоффом [493] и С. Харрисоном [494], а в экспериментальном Дж. Филлипсом и соавт. [495]. В последней работе получены четкие фотографии дифракционных рефлексов от радиации электронно-позитронного синхротрона, рассеиваемой плоскостями монокристаллов белковых молекул рубредоксина, азурина, фактора роста нервных клеток и *L*-глутамин-аспарагиназы. Некоторые условия эксперимента приведены в табл. 1.9. Авто-

Дифракционные данные, полученные с синхротронным излучением [495]

Белок	Разрешение, Å	Рассеивающая плоскость	Длина волны, Å	Время экспозиции, ч	Размеры кристалла, мм
Рубредоксин	1,7	hk0	1,74	5	0,50-0,40-0,30
Азурин	2,7	3-D	1,38	2	0,40-0,35-0,12
Фактор роста	6,0	h0l	1,74	5	0,30-0,10-0,10
L-Glu-Asp-аза	3,5	h0l	1,38	2	0,50-0,05-0,05

ры показали, что при замене излучения западной рентгеновской трубки на синхротронную радиацию (при сохранении прочих условий эксперимента) интенсивности пучков дифракционного рассеяния теми же кристаллами белков возрастают более чем в 60 раз и, следовательно, во столько же раз уменьшается время экспозиции. Не сбылись опасения быстрого распада кристаллов в синхротронном потоке. Напротив, из-за уменьшения экспозиции скорость разрушения исследованных объектов оказалась существенно ниже, чем при использовании Ni-отфильтрованной CuK_α -радиации. Вместе с упомянутыми достоинствами авторы также отмечают низкое угловое расхождение потока и легкую настраиваемость синхротрона на выбранную длину волны, что облегчает селективную оптимизацию аномальных вкладов фактора рассеяния. В заключении сделан вывод о перспективности нового источника излучения в структурном изучении белков. Действительно, значительное увеличение интенсивности рассеяния, сокращение времени экспозиции, несколько менее жесткие требования к размерам облучаемых кристаллических образцов и ряд других полезных качеств этого источника открыли перед рентгеноструктурным анализом белков неведомые ранее возможности в исследовании микрокристаллических белковых объектов, проведении динамических и иных экспериментов, о некоторых из которых рассказывается ниже. В настоящее время более трети работ в области рентгеновской кристаллографии белка выполняется с использованием синхротронного излучения.

В табл. I.10 приведены некоторые данные рентгеноструктурного анализа белков, дифракционные картины которых были получены при использовании синхротронной радиации (1–8, 17–20) и K_α -излучения рентгеновских трубок с вращающимися медными анодами (9–16). Табл. I.10 отражает лишь небольшую часть публикаций конца 1993–первой половины 1994 гг., посвященных расшифровке трехмерных структур белковых молекул и их комплексов. Если судить о достоинствах двух методов рентгеноструктурного анализа по величинам разрешения и фактора расходимости (R), то следует заключить, что природа источника излучения практически не отражается на конечном результате. При использовании как синхротронной радиации, так и излучения рентгеновской трубки удалось расшифровать простран-

ственное строение белковых молекул с рекордным разрешением, преодолев в обоих случаях одноангстремный барьер [бактериальный трипсин (2) и крамбин (13)] и достигнув при этом расходимости около 10% величины, близкой фактору R в уточнениях структур небольших органических молекул.

Заметно не отличаются методы и в отношении размеров облучаемого кристалла и диаметра фокусного пятна. Так, при определении трехмерной структуры антитела Fab 17/9 (16) с использованием излучения рентгеновской трубки Elliott Gx18 с вращающимся анодом образец имел размеры 0,30-0,04-0,02 мм³, а фокусное пятно составляло всего 0,1 мм. Эти параметры явно не уступают условиям эксперимента с синхротронной радиацией. Можно однако полагать, что ситуация с кристаллизацией белков в последнем случае потенциально несколько предпочтительнее, так как мощное синхротронное излучение и его острый фокус позволяют использовать кристаллы, имеющие меньшие размеры и содержащие большие элементарные ячейки. Примеров, иллюстрирующих такую возможность, пока нет. На сегодняшний день проблема кристаллизации белков в обоих случаях стоит столь же остро, как и десятки лет назад. О трудностях получения качественных монокристаллов требуемой величины говорится почти во всех работах. Типично в этом отношении замечание авторов, исследовавших трехмерную структуру фермента из 839 аминокислотных остатков, липокси-геназу I: "Кристаллы белка удалось получить после опробования более тысячи различных условий кристаллизации" [516. С. 1482]. Особенно сложное положение, как уже отмечалось, с кристаллизацией мембранных белков (о предпринимаемых здесь усилиях и относительных успехах см. [517–520]).

Сопоставление приведенных в табл. I.10 данных приводит к выводу, что методы рентгеноструктурного анализа, использующие синхротронную радиацию и излучение рентгеновской трубки, не обладают друг перед другом ощутимыми преимуществами при изучении нативных конформаций белковых молекул и их стабильных комплексов, т.е. во всех тех случаях, когда решается статическая задача определения атомных трехмерных структур. До недавнего времени полагали, что в компетенцию рентгеноструктурного анализа по принципиальным соображениям не может входить рассмотрение вопросов, касающихся динамики межмолекулярных и внутримолекулярных взаимодействий белков. Использование синхротронного излучения заставило если и не изменить такое представление на противоположное, то во всяком случае поставить под сомнение его безапелляционность. Как видно из табл. I.10, новый источник излучения снижает время экспозиции с многих десятков часов (9), дней (16) и даже недель (11) до долей секунд (3,5). Дж. Томас в статье, посвященной 80-летию юбилею методов Брэгга и Лауэ, отмечает, что дифракционные рефлексы белковых кристаллов, облучаемых синхротронной радиацией, могут быть измерены за 100 пс, т.е. 10^{-10} с [521]. Значительное сокращение экспозиции не только позволяет существенно сократить время анализа трехмерной структуры белка, но и открывает принципиально новую

**Данные рентгеноструктурного анализа белков, полученные с использованием синхротронной радиации
и излучения рентгеновских трубок**

№ п/п	Белок	Источник	Молекулярная масса, кДа	Данные о структуре	Разрешение *, Å	R-фактор **, %	Примечание	Литература
1	Гемагглютнинин	Influenza virus	60	Гомотримерные комплексы гликопротеина с рецепторными аналогами	2,15	21,6	Размеры кристалла: 0,70·0,70·0,70 мм ³ ; синхротронное излучение $\lambda=0,905$ Å; время экспонирования 1,39 (φ=0–44,4°) и 3,33 (φ=45–90°) мин/град, температура 108 K	[496]
2	Бактериальный трипсин	Nocardiopsis	20	Мономер	0,96	10,7	Синхротронное излучение; температура 120 K	[497]
3	Цитохром-с-пероксидаза (CCP)	Дрожжи	34	Fe-гемсодержащий фермент	2,2	15,8	Размеры кристалла: 0,40·0,40·1,0 мм ³ ; полихроматическое синхротронное излучение (дифракция Лауэ); время одной экспозиции 300–400 мс; температура 6°C	[498]
4	Транскетолаза	S. cerevisiae	148	Гомодимер	2,0	15,7	Синхротронное излучение	[499]

Т а б л и ц а 1.10 (продолжение)

№ п/п	Белок	Источник	Молекулярная масса, кДа	Данные о структуре	Разрешение *, Å	R-фактор **, %	Примечание	Литература
5	л-Гуанидин-бензоил-замещенный трипсин	Бык	24	Мономер	2,0	22,1	Размеры кристалла: 1,0·0,40·0,40 мм ³ ; полихроматическое синхротронное излучение (дифракция Лауэ); время одной экспозиции 800 мс; pH 5,5–8,5	[500]
6	β-Галактозидаза	E. coli	465	Гомотетрамер	3,5	19,3	Синхротронное излучение	[501]
7	Глюкоздегидрогеназа	Thermoplasma acidophilum	160	»	2,9	12,4	Размеры кристалла: 1,50·0,30·0,20 мм ³ ; CuK _α -излучение трубки с вращающимся анодом и синхротронное излучение	[502]
8	Ренин	Мышь	40	Фермент-ингибиторный комплекс	2,0	18,0	CuK _α -излучение трубки (разрешение 3,0 Å) и синхротронное излучение (разрешение 2,0 Å)	[503]

Т а б л и ц а I.10 (продолжение)

№ п/п	Белок	Источник	Молекулярная масса, кДа	Данные о структуре	Разрешение *, Å	R-фактор **, %	Примечание	Литература
9	Галоалкандегалогеназа	Xanthobacter autotrophicus	36	Мономер	1,9	16,6	Размеры кристалла: 0,40-0,40-0,15 мм ³ ; монохроматизированное графитом CuK _α -излучение трубки Elliott. Трубка Elliott Gx21 с вращающимся анодом; время экспозиции 48 ч	[504]
10	Гормон роста	Человек	22	Мономер	2,0	18,5	Размеры кристалла: 0,25-0,25-0,15 мм ³ ; источник CuK _α -излучения – трубка RU200 с вращающимся анодом	[505]
11	Аконитаза	Бык, свинья	83	Комплексы фермента с транс-аконитатом и нитроцитратом	2,05	17,0	Размеры кристалла: 0,70-0,70-0,20 мм ³ ; монохроматизированное никелем CuK _α -излучение трубки Gx21 с вращающимся анодом; время экспозиции 12–18 дней; фокусное пятно 0,2 мм	[506]

Т а б л и ц а I.10 (продолжение)

№ п/п	Белок	Источник	Молекулярная масса, кДа	Данные о структуре	Разрешение *, Å	R-фактор **, %	Примечание	Литература
12	Пируваткиназа	Loctobacillus plantarum	270	Гомотетрамер	2,1	16,2	Размеры кристалла: 0,70-0,70-0,70 мм ³ ; использовалось CuK _α -излучение трубки RU220B с вращающимся анодом и синхротронное излучение; температура 4°C	[507]
13	Крамбин	Crambe abyssinica	5,5	Мономер	0,83	10,5	Монохроматизированное графитом CuK _α -излучение трубки Nicolet LT-1; каждая из 32322 рефлексий сканировалась с постоянной скоростью 58,6° в 1 мин; температура 130 K	[508]
14	Токсин II	Androctonus australis	7	»	1,3	14,8	Запаянная трубка с CuK _α -радиацией и Ni-фильтром, трубка Elliott Gx21 с вращающимся анодом	[509]
15	Онкомодулин	Опухолевые клетки	12	»	1,30	16,9	Размеры кристалла: 0,20-0,60-0,80 мм ³ ; монохроматизированное CuK _α -излучение трубки Elliott Gx16 с вращающимся анодом	[510]

Т а б л и ц а I.10 (продолжение)

№ п/п	Белок	Источник	Молекулярная масса, кДа	Данные о структуре	Разрешение *, Å	R-фактор **, %	Примечание	Литература
16	Антитело Fab 17/9	IgG2	26	Комплекс Fab 17/9 с пептидом 101–107 гемагглютинирующего вируса гриппа	2,80	19,0	Минимальные размеры кристалла: 0,30·0,04·0,02 мм ³ ; CuK _α -излучение трубки Elliott G×18 с вращающимся анодом; фокусное пятно 0,1 мм; температура – 150°C; время экспозиции свыше 10 дней	[511]
17	Домен GH5 линкерного гистона (фрагмент 24–96)	Эритроциты птиц	8,5	Мономер	2,5	25,0	Синхротронное излучение трех длин волн 0,9802, 0,9795 и 0,9150 Å, соответствующих полосе поглощения Se. Фазирующее по методу мультидлинноволновой аномальной дисперсии. Рекombинантная последовательность [Se-Met]–GH5 продуцировалась плазмидами E. coli	[512]

Т а б л и ц а I.10 (окончание)

№ п/п	Белок	Источник	Молекулярная масса, кДа	Данные о структуре	Разрешение *, Å	R-фактор **, %	Примечание	Литература
18	Эндонуклеаза BamHI (нативная и Se-Met)	Bacillus amyloliquefaciens	25	Гомодимер	1,95	19,0	CuK _α -излучение трубки R U200 с вращающимся анодом и синхротронное излучение; углы рассеяния соответствовали длинам волн при крае поглощения Se (0,979 Å), пике поглощения (0,978 Å) и в удаленной от поглощения точке (0,900 Å); температура 5°C. Использован метод МАД на нескольких длинах волн	[513]
19	Гонадотропин (нативный и Se-Met)	Человеческий эмбрион	28	Гетеродимер	2,6	19,9	Синхротронное излучение; аномальная дифракция на четырех длинах волн Se (МАД); температура 277, 293 и 110 К.	[514]
20	Глутамин-5-фосфорибозил-1-пирофосфат амидотрансфераза	Bacillus subtilis	210	Гомотетрамер	3,0	22,4	Синхротронное излучение; аномальная дифракция на трех длинах волн на атомах Fe в четырех [4Fe–4S] кластерах тетрамера (МАД)	[515]

* В кристаллографии белка разрешение определяется минимальным межплоскостным расстоянием ($d_{\min}$), в пределах которого собраны дифракционные данные (или в пределах которого значения фактора рассеяния F включены в расчет рядов Фурье).

** Фактор расходимости R контролирует эффективность уточнения и определяется по формуле:

$$R = \frac{\sum |F_{\text{эксп}} - F_{\text{расч}}|}{\sum F_{\text{эксп}}} \cdot 100.$$

перспективу для изучения механизмов протекающих в белковых кристаллах процессов путем исследования трехмерных структур промежуточных соединений, время жизни которых продолжительно, или оно может быть пролонгировано при изменении внешних условий. Открывающиеся здесь возможности делают метод рентгеноструктурного анализа еще более уникальным. Можно с уверенностью предположить, что использование синхротронного излучения позволит непосредственно наблюдать за кинетикой конформационных и химических изменений структур белков на атомном уровне по ходу, например, ферментативных реакций. О том, что такая возможность появится в самом недалеком будущем, свидетельствуют результаты попыток последних двух лет подойти к рассмотрению динамических проблем молекулярной биологии с помощью рентгеноструктурного анализа. Есть даже работа, обсуждаемая ниже, в которой такого рода задачу пытаются решить, используя традиционный источник излучения рентгеновскую трубку.

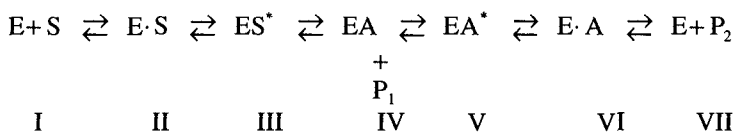
Механизм функционирования галоалкандегалогеназы. Авторы ряда работ применили рентгеновскую кристаллографию к изучению механизма каталитического акта галоалкандегалогеназы (табл. I.10) [503 – 505]. Трехмерные структуры фермента, монокристалл которого постоянно находится в маточном растворе, были расшифрованы по картам электронной плотности, рассчитанным по дифракциям образца в отсутствие и в присутствии субстрата 1,2-дихлорэтана [504]. При pH 5 и 4°, условия, далеко от оптимального, (pH 8,2 и 22°), субстрат связывался с активным центром, однако развития каталитической реакции не происходило. Образовавшийся невалентный фермент-субстратный комплекс Михаэлиса оставался стабильным как угодно долго, и поэтому его структура могла быть определена при использовании излучения рентгеновской трубки, экспозиции в 48 ч и сохранении всех других условий анализа нативного фермента. Найденное расположение субстрата в активном центре в схематической форме представлено на рис. I.39. Один атом хлора (Cl_1) в комплексе располагается на расстояниях 3,6 и 3,2 Å от атомов азота боковых цепей Tgr-125 и Tgr-175 и взаимодействует с водородами двух связей N–H. Другой атом хлора (Cl_2) стабилизирован дисперсионными взаимодействиями с бензольными кольцами Phe-128 и Phe-172. В найденной конформации субстрата в активном центре атом углерода C_1 сближен с кислородом $\text{O}^{\delta 1}$ боковой цепи Asp-124 (3,8 Å), что главным образом и обуславливает продуктивность невалентного комплекса. При нагревании кристаллического образца до комнатной температуры происходит разрыв связи $\text{C}_1\text{--Cl}_1$, сопровождаемый образованием иона Cl_1^- и алкилированием кислорода $\text{O}^{\delta 1}$ остатка Asp-124. Именно на такое изменение комплекса указывает расшифрованная трехмерная структура, которая возникает и остается стабильной в условиях pH 5 и 22°. Ее схема приведена на рис. I.40. Наконец, при pH 6,2 и 22° алкилированный фермент гидролизует молекулой воды, активированной боковыми цепями взаимодействующих друг с другом остатков His-289 и Asp-260. Продукты

реакции удаляются, а фермент возвращается в исходное состояние, что и фиксирует рентгеноструктурный анализ.

Таким образом, в работе [504] экспериментально подтвержден двухступенчатый механизм реакции галоалкандегалогеназы, предложенный ранее [522]. В каталитической реакции этого фермента, протекающей в условиях *in vivo*, время жизни промежуточных продуктов слишком коротко для проведения кристаллографического исследования. Авторам удалось путем изменения pH и температуры замедлить процесс, разделить его на две стадии и изучить атомные трехмерные структуры с разрешением 2,0–2,4 Å и R-фактором 16, 5–19, 5% соответствующих фермент-субстратных комплексов. Показано, что центральную роль на первой стадии алкилирования играет в качестве нуклеофила карбоксильная группа остатка Asp-124, а на второй стадии деалкилирования – молекула воды, атакующая центральный атом углерода сложноэфирной группы ковалентного промежуточного соединения.

Деацилирование трипсина. Аналогичное по своей направленности исследование одновременно было проведено П. Зингером и соавт.: с классическим в энзимологии объектом, трипсином [500]. Использован кристаллографический метод Лауэ с временным разрешением и полихроматическим синхротронным излучением.

Трудами многих исследователей, прежде всего М. Бендера и В. Дженкса, уже давно была разработана химическая схема каталитического акта сериновых протеиназ, в том числе трипсина [523–525]:



Механизм триптического гидролиза, согласно предложенной схеме, включает последовательную цепочку химических стадий взаимодействия фермента и субстрата, протекающих через ковалентные промежуточные состояния. Каталитический процесс начинается с образования невалентного комплекса Михаэлиса (II), в котором гидроксил Ser-195 и имидазольное кольцо His-57 фермента оказываются сближенными соответственно с карбонильной и амидной группами расщепляемой пептидной или сложноэфирной связи субстрата. В результате их согласованных взаимодействий невалентное фермент-субстратное связывание переходит в ковалентное с образованием сначала малоустойчивого промежуточного соединения так называемого тетраэдрического аддукта (III). Последний распадается на ацилфермент и амин (IV), а при гидролизе сложного эфира на ацилфермент и спирт. Далее следует деацилирование, которое проходит в принципе аналогичным образом, но в обратном порядке и с участием в качестве нуклеофильного агента не атома OY боковой цепи Ser-195, а молекулы воды. Вновь образуется метастабильный тетраэдрический аддукт (V).

распадающийся, проходя стадию невалентного комплекса (VI), на исходный фермент и второй продукт реакции (VII). Химический механизм действия протеолитических сериновых ферментов был разработан до появления результатов рентгеноструктурного анализа пространственного строения их молекул.

Кристаллографическая структура нативного трипсина с разрешением 1,8 Å, позднее уточненная до 1,5 Å, была установлена Р. Штраудом и соавт. [526–528], а также Р. Хубером, В. Боде и соавт. [529–531]. Геометрия активного центра идентифицирована на основе результатов рентгеноструктурного анализа комплексов трипсина с белковыми ингибиторами животного и растительного происхождения [532–534] и необратимыми синтетическими ингибиторами [535]. Показано, что во взаимодействии с субстратом и при образовании промежуточных продуктов катализа непосредственно участвуют гидроксильная группа остатка Ser-195 и имидазольное кольцо His-57, которые расположены на поверхности белковой глобулы и образуют водородную связь $N^{\epsilon 2} \dots H-O\gamma$. Остаток His-57 сближен также с Asp-102, и между ними реализуется взаимодействие $N^{\delta 1}-H \dots O^{\delta 2}$.

Вернемся теперь к работе Зингера и соавт. [500], в которой с помощью рентгеновской дифракции синхротронного излучения изучен механизм действия трипсина на второй стадии каталитического акта (IV–VII). Исследование началось с приготовления устойчивого промежуточного соединения ферментативной реакции ацилфермента (VI) путем присоединения *n*-гуанидинбензоата (GB) к Ser-195 трипсина, находящегося в кристаллическом состоянии в маточном растворе при pH 5,5. При быстром повышении pH до 8,5 возникал процесс, который контролировался методом трехмерной Лауэ-кристаллографии. Дифракция рентгеновских лучей фиксировалась при трех сериях облучений различных участков кристаллического образца с пятисекундной экспозицией одной съемки в каждой серии. Первая серия экспозиций проведена до впрыскивания в проточную ячейку буферного раствора при pH 8,5, а вторая и третья серии соответственно через 3 и 90 мин после (t_0 , t_3 , t). Пространственные структуры трех фермент-субстратных комплексов расшифрованы с разрешением 1,8 Å и R-факторами расходимости около 20%. Средние различия между координатами атомов этих структур приведены в табл. I.11. Сопоставление структур до и после повышения pH показало, что одна из находящихся в активном центре фермента молекул воды предрасположена к атаке ацильной группы на стадии инициации гидролиза ацилфермента и по ходу реакции обнаруживает тенденцию к сближению с карбонильным углеродом. Таким образом, декларация об участии воды в процессе деацилирования трипсинового промежуточного продукта превращается из вероятного предположения М. Бендера, В. Дженкса и Д. Блоу в экспериментальный факт.

Структура промежуточного соединения первой стадии реакции цитохром-с-пероксидазы с перекисью водорода. Согласно существующему представлению, цитохром-с-пероксидаза (CCP) катализирует вос-

Среднеквадратичные отклонения в положениях (Å) атомов отдельных групп в трех разрешенных во времени Лауэ-структурах трипсина

Структура	Все атомы белка	Атомы основной цепи	Атомы боковых цепей	Внутренние остатки	Внешние остатки	Группа GB
t_0-t_3	0,37	0,19	0,51	0,23	0,44	0,13
t_0-t_{90}	0,22	0,17	0,27	0,20	0,24	0,24
t_3-t_{90}	0,32	0,14	0,46	0,17	0,39	0,21

становление перекисей по механизму, состоящему из следующих трех стадий [536—539]:

1. $\text{ССР} (\text{Fe}^{\text{III}}) + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{соединение I} (\text{Fe}^{\text{IV}}\text{O}^{2-}, \text{Trp-191}^*) + \text{H}_2\text{O}.$
2. $\text{Соединение I} (\text{Fe}^{\text{IV}}\text{O}^{2-}, \text{Trp-191}^*) + \text{Cyt-c}-(\text{Fe}^{\text{II}}) + \text{H}^+ \rightarrow$
 $\rightarrow \text{соединение II} (\text{Fe}^{\text{IV}}\text{O}^{2-}) + \text{Cyt-c}-(\text{Fe}^{\text{II}}).$
3. $\text{Соединение II} (\text{Fe}^{\text{IV}}\text{O}^{2-}) + \text{Cyt-c}-(\text{Fe}^{\text{II}}) + \text{H}^+ \rightarrow$
 $\rightarrow \text{ССР} (\text{Fe}^{\text{III}}) + \text{Cyt-c}-(\text{Fe}^{\text{III}}) + \text{H}_2\text{O}.$

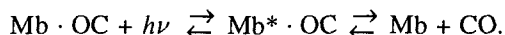
На первой стадии реакции цитохром-с-пероксидазы с перекисью водорода образуется дважды окисленный промежуточный продукт, получивший название "соединение I". Цель рассматриваемой ниже работы В. Фюлепа и соавт. [498] заключалась в установлении атомных трехмерных структур нативного фермента и соединения I и выяснении конформационных изменений ССР, происходящих при образовании промежуточного продукта, на первой стадии катализа.

Соединение I получено в кристаллической форме из дрожжевой ССР при реагировании кристаллического фермента, помещенного в маточном растворе в проточную ячейку, с находящейся в маточном растворе H_2O_2 . Реакция между ферментом и H_2O_2 , протекание которой регистрировалось с помощью спектров поглощения в видимой области (550—750 нм), почти полностью завершалась при 6° через несколько минут. После этого концентрация образовавшегося соединения I оставалась практически неизменной (90—95%) по крайней мере в течение получаса. Трехмерные структуры нативного фермента и его первого промежуточного производного расшифровывались методом Лауэ-кристаллографии с разрешением 2,2 Å и R-факторами расходимости ~ 15,8% (табл. I.10 и I.11). Кристаллические образцы имели размеры 0,4 · 0,4 · 1,0 мм³. Использовалась полихроматическая синхротронная радиация; время одной экспозиции составляло около 0,3 с. Всего было сделано четыре серии независимых экспериментов на четырех кристаллах при четырех различных ориентациях образцов (4 для нативного фермента и 4 для соединения I). При сопоставлении геометрии найденных структур авторы обнаружили изменения, вызванные переходом ССР в соединение I. Они коснулись только области активного центра, причем

главным образом его дистальной части (рис. I.41). В нативном состоянии фермента лигандсвязывающий карман над атомом железа заполнен тремя молекулами воды. При образовании фермент-субстратного комплекса две из них вытесняются, а третья немного смещается, но по-прежнему остается связанной с остатком Trp-51 и Fe-содержащей группой гема. После возникновения соединения I и гетеролитического расщепления пероксидной связи атом субстратного кислорода связывается с железом, изменяя его окисное состояние от высокоспинового ферридо- до низкоспинового ферро-состояния ($\text{Fe}^{\text{III}} \rightarrow \text{Fe}^{\text{IV}}$). Атом железа, образовав связь Fe—O на расстоянии $\sim 1,7 \text{ \AA}$, перемещается на $0,3 \text{ \AA}$ от плоского гема в направлении дистального His-52. Расположенная несколько в стороне боковая цепь Arg-47 смещается на $1,3 \text{ \AA}$ к ферро-кислородному атому и образует с ним водородную связь. Расстояния между ферро-кислородом и атомом N $^{\epsilon}$ остатка Arg-48 составляют $2,8 \text{ \AA}$, атомом N $^{\epsilon 1}$ остатка Trp-51 — $2,7 \text{ \AA}$ и атомом N $^{\epsilon}$ His-52 $3,6 \text{ \AA}$, что слишком велико для водородной связи.

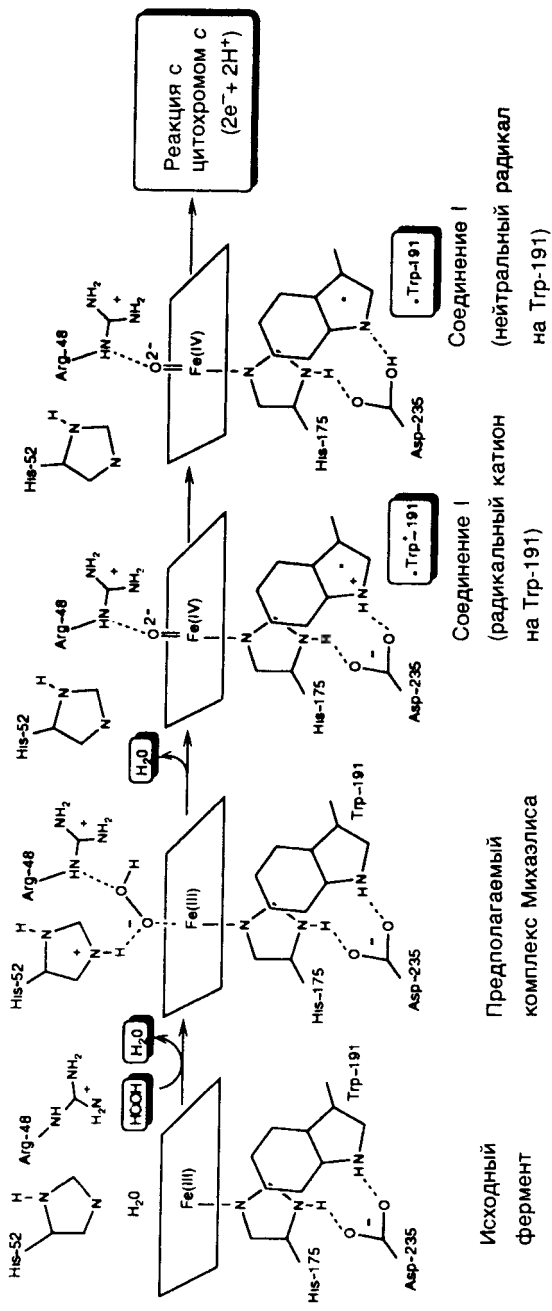
При образовании соединения I индольное кольцо проксимального остатка Trp-191, отдавая электрон ферро-кислороду, окисляется. Возникший катион-радикал с зарядом на атоме индольного азота взаимодействует посредством водородной связи $\text{N}^+ \cdots \text{O}^{\delta 1}$ с кислородом заряженной кзрбоксильной группы боковой цепи Asp-235; второй кислород этого остатка ($\text{O}^{\delta 2}$) связан с группой N—H His-175. Поскольку заметное изменение геометрии активного центра в этой области отсутствует, высказанные соображения о распределении электронной плотности в проксимальных остатках представляют собой лишь одну из версий.

Фотолиз комплекса миоглобина с окисью углерода ($\text{Mb} \cdot \text{OC}$). Недавно были опубликованы два структурных исследования этого комплекса, которые в экспериментальном отношении можно считать вершинами современной белковой кристаллографии [540, 541]. Обе работы посвящены изучению механизма фотодиссоциации ингибированного окисью углерода миоглобина:

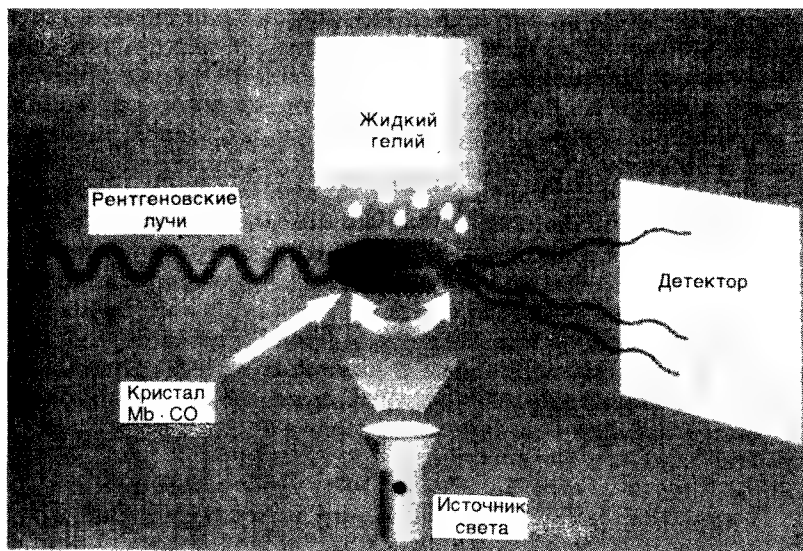


Цели обеих работ состояли в определении положения молекулы CO в переходном состоянии и выяснении реакции активного центра белка на разрыв связи Fe—O. Экспериментальное решение и той и другой задачи требовало невозможного от традиционного метода рентгеноструктурного анализа, а именно установления трехмерной структуры короткоживущего промежуточного комплекса $\text{Mb}^* \cdot \text{OC}$ и сопоставления со структурами нативного миоглобина и его ингибиторного комплекса. Однако в настоящее время подобные задачи (а их великое множество) поддаются решению с привлечением синхротронного излучения, требующего незначительных экспозиций (в рассматриваемых двух случаях нескольких минут).

И. Шлихтинг и соавт. в качестве объекта исследования выбрали мутантный миоглобин, образующий гексагональную кристаллическую



Р и с. I.41. Схема образования соединения I при взаимодействии цитохром-с-пероксидазы с перекисью водорода [498]



Р и с. I.42. Схема экспериментальной установки для получения рентгеновской дифракции кристаллами миоглобина с окисью углерода в процессе фотолиза [540—542]

решетку [540]. Образец охлаждался жидким гелием до ~ 20 К и облучался для получения дифракционной картины синхротронной радиацией, а для инициации и поддержания фотолиза видимым светом от обычного источника (рис. I.42). По аналогичной схеме строился эксперимент в работе Т. Тенга и соавт. [541]. Различия заключались в использовании нативного миоглобина (из спермы кита), кристаллы которого имеют не гексагональную решетку, а моноклинную; образец охлаждался до температуры ~ 40 К и облучался мощным лазерным источником света. Результаты обоих исследований, за исключением некоторых количественных расхождений в оценке конформационных изменений активного центра миоглобина, совпали. Было найдено, что при фотодиссоциации комплекса молекула CO удаляется от атома Fe, но остается в активном центре и располагается параллельно плоскости группы гема на расстоянии $\sim 3,6$ Å. Атом Fe одновременно смещается в ту же сторону на расстояние $0,2$ Å [540]. Помимо этого Шлихтинг и соавторы отметили изменения при фотолизе положений боковых цепей дистальных His, Arg и проксимального His, а также α -спирали F. Т. Тенг и соавторы таких наблюдений не сделали, что, по-видимому, нельзя объяснить разной упаковкой кристаллов нативного и мутантного миоглобина. Г. Филлипс ранее показал, что мутация образца, использованного в работе [540], не вызывает конформационных изменений в трехмерной структуре белка и не влияет на его физиологические свойства [543]. Отмеченные структурные изменения при фотолизе согласуются со спектральными данными и результатами расчета молекулярной динамики [544—547].

В этом разделе были рассмотрены результаты опубликованных

к концу 1994 г. рентгеноструктурных исследований механизма функционирования белков, выполненных с привлечением синхротронного излучения. Таких работ пока немного, но именно они отражают принципиальную тенденцию развития метода. Если несколько лет назад его задача могла формулироваться только как изучение трехмерных структур белковых молекул и их стабильных комплексов, то теперь доступными для исследования на том же атомном уровне становятся трехмерные структуры промежуточных соединений. Таким образом, рентгеноструктурный анализ перешел, ничего при этом не теряя в разрешающей способности и достоверности получаемых результатов, от изучения молекулярной морфологии начальных и конечных продуктов физиологических реакций к молекулярной морфологии промежуточных соединений. Это событие знаменует собой скачок в развитии метода, качественное изменение его возможностей в решении огромного числа новых задач молекулярной биологии.

4.2. МУЛЬТИДЛИННОВОЛНОВАЯ АНОМАЛЬНАЯ ДИФРАКЦИЯ

Самой сложной проблемой рентгеновской кристаллографии белка является фазовая проблема. Именно она около двух десятилетий, когда уже имелась полная ясность в отношении всех других принципиальных вопросов рентгеноструктурного анализа, сдерживала расшифровку дифрагированных белковыми кристаллами пучков лучей, построение карт электронной плотности и установление трехмерных молекулярных структур. Реконструирование пространственного строения белка по наблюдаемым в дифракционной картине многим тысячам рефлексов возможно лишь при знании амплитуды и фазы каждого из них. И если значение амплитуды можно оценить путем прямого измерения интенсивности вторичного рентгеновского излучения, то фаза есть расчетный параметр, нахождение которого непременно связано с привлечением дополнительного экспериментального материала.

Решение фазовой проблемы было найдено введением в рентгеноструктурный анализ белка его изоморфных производных невалентных комплексов белка с тяжелыми атомами (Au, Pb, Hg, Ag, Tl и др.), присоединение которых не должно искажать пространственного строения белковой молекулы и кристаллической решетки. Тяжелые атомы обладают большой электронной плотностью и, следовательно, значительной интенсивностью томсоновского упругого рассеяния, что сказывается на структурных факторах многих рефлексов и заметно изменяет картину рентгеновской дифракции. Различие интенсивностей дифрагированных пучков кристаллами нативного белка и его производных можно использовать для определения фаз, если предварительно установить положения тяжелых атомов. Существует несколько различных способов решения этой задачи [198, 548].

Метод определения фаз с помощью тяжелых атомов, получивший название мультиплетного изоморфного замещения (МИЗ), впервые был

опробован в 1954 г. Перутцем и соавт. в исследовании кристаллографической структуры гемоглобина [549]. До самого последнего времени он оставался практически единственным подходом к расчету требуемых фазовых углов. Все эти годы, однако, не прекращался поиск альтернативного подхода, поскольку метод МИЗ весьма далек от совершенства. Поиск необходимых производных строится путем "проб и ошибок" и в каждом отдельном случае требует доказательства того, что присоединение тяжелых атомов не вызывает искажений в структуре белковой молекулы, т.е. действительно является изоморфным. Подтверждение изоморфизма не всегда возможно, поскольку не все нарушения можно выявить без предварительного знания структуры кристалла нативного белка. Трудности эксперимента, сопутствующие применению метода изоморфного замещения, сказываются на чисто научной стороне исследования, сужая спектр решаемых задач.

Различия в интенсивностях пучков дифракционного рассеяния, вызванные введением в кристаллическую решетку молекул белка тяжелых атомов, могут быть обусловлены не только вкладами от вынужденных колебаний электронов этих атомов, т.е. нормальным рассеянием рентгеновских лучей. Помимо этого, при определенных условиях, рассматриваемых ниже, изменения в интенсивностях рефлексов могут возникать в результате так называемого аномального рассеяния. Классическая теория данного явления была развита еще в 1933 г. Г. Хенлом [550].

В трактовке дифракции рентгеновских лучей кристаллами белка и его изоморфных производных предполагается, что принадлежащие атомам электроны являются свободными и в таком состоянии приводятся в вынужденные колебания с частотой ω , равной частоте первичного рентгеновского излучения. Амплитуда нормального, упругого рассеяния $[f^0(\Theta)]$ зависит от брэгговского угла (Θ), определяющего направление в пространстве дифрагированного луча, но не зависит от длины волны (λ). В общем случае это предположение некорректно, поскольку электроны в атомах не являются свободными, а взаимодействуют, особенно эффективно на внутренних K - и L -орбиталях, с ядром и друг с другом. В классической теории рассеивающие атомные центры рассматриваются наборами дипольных осцилляторов, имеющих собственные частоты колебаний (ω_s), которые равны частотам поглощаемого атомом электромагнитного излучения. Когда частота падающей волны значительно отличается от частот собственных колебаний электронов ($\omega \gg \omega_s$ или $\omega \ll \omega_s$), интенсивность дифрагированного луча практически полностью определяется нормальным рассеянием, и поэтому поглощением обычно пренебрегают, т.е. считают $\omega_s = 0$. Однако если частота рентгеновского излучения становится сопоставимой с частотами собственных колебаний электронов ($\omega \sim \omega_s$), возникает резонанс, изменяющий амплитуду и фазу рассеяния. Имеет место аномальное рассеяние.

Фактор аномального рассеяния $[f^A(\lambda)]$, связанный только с резонансным эффектом, мало чувствителен к величине угла рассеяния, но

сильно зависит от длины волны облучаемой радиации, т.е. обнаруживает заметную дисперсию волн. Фактор $f^{\Delta}(\lambda)$ является комплексной величиной $f^{\Delta}e^{ik}$ (k — коэффициент затухания) и содержит вещественную дисперсную компоненту аномального рассеяния (f') и мнимую абсорбционную компоненту аномального рассеяния (f''). Абсолютная величина f'' пропорциональна коэффициенту поглощения, поэтому она приобретает большее значение, когда падающая частота близка к краю поглощения. Таким образом, общее рассеяние представляет собой сумму факторов нормального и аномального рассеяния:

$$f^0(\Theta) + f^{\Delta}(\lambda) = f(\Theta, \lambda).$$

Фактор $f^{\Delta}(\lambda)$ включает два компонента, и поэтому в общем случае можно написать:

$$f = f^0 + f^{\Delta}e^{ik} = f^0 + f' + f''.$$

Кристаллическая решетка белков, не содержащих аномально рассеивающих центров, дифрагирует рентгеновские лучи от обычной трубки с медным анодом нормально. Аномальное рассеяние в этом случае отсутствует, так как частоты собственных колебаний ω , атомов Н, С, N, О и S весьма далеки от частоты $\omega_{K\alpha}$ -излучения для возникновения резонанса. Общая дифракция белкового кристалла, обладающего аномально рассеивающими центрами, описывается для каждого измеренного рефлекса структурным фактором ${}^{\lambda}F_T(h)$. Он включает нормальную часть — ${}^0F_T(h)$, состоящую из рассеивающих компонент от всех атомов структуры белка, и аномальную часть. Последняя равна произведению нормальных компонент аномально рассеивающих центров $[{}^0F_A(h)]$ на отношение факторов аномального к нормальному рассеянию — $f^{\Delta}(\lambda)/f^0(\Theta)$. Следовательно,

$${}^{\lambda}F_T(h) = {}^0F_T(h) + {}^0F_A(h) f^{\Delta}(\lambda)/f^0(\Theta).$$

Дж. Карле в 1980 г. [551] и позднее У. Хендриксоном [552] было показано, что прецессионные измерения всех дифракционных рефлексов от одного кристаллического белкового образца с аномальным рассеянием, полученным при нескольких (3—5) длинах волн рентгеновского излучения, позволяют по набору экспериментальных данных $|{}^{\lambda}E|$ рассчитать вещественные составляющие факторов $|{}^0F_T|$, $|{}^0F_A|$ и $\Delta\phi - \phi_T^0 - \phi_A^0$. Значения $|{}^0F_A|$ используют для определения пространственного расположения центров аномального рассеяния, и на этой основе рассчитывают сначала значения ϕ_A^0 , а затем, зная $\Delta\phi^0$, значения ϕ_T^0 .

Таким образом, фазовая проблема может быть решена и без привлечения метода мультиплетного изоморфного замещения. Однако цена такого решения долгое время оставалась слишком обременительной для того, чтобы новый подход нашел широкое применение. Хотя он и достигал той же, что и метод МИЗ, цели, причем делал это

при использовании не нескольких, а лишь одного белкового кристалла, тем не менее требовал соблюдения по крайней мере двух трудно-выполнимых условий. Во-первых, исследуемый образец должен содержать аномально рассеивающие атомы, которых в нативном белке может не оказаться. Во-вторых, для оптимизации эффекта аномального рассеяния необходимо непрерывно настраиваемый на разные длины волн с высокой точностью и в широком спектральном диапазоне источник рентгеновского излучения. Первое условие не ведет к дополнительным осложнениям лишь в случае металлопротеинов, а второе требует полихроматической радиации и, следовательно, практически исключает применения рентгеновских трубок. В настоящее время отмеченные трудности метода мультидлинноволновой аномальной дифракции (МАД) в основном преодолены, что будет ясно из последующего изложения, и решающую роль начинают играть его очевидные преимущества перед традиционным подходом к решению фазовой проблемы (МИЗ). Число публикаций, посвященных рентгеноструктурному анализу белков с использованием МАД, растет и в ближайшем будущем этот процесс, по-видимому, приобретет лавинообразный характер.

В первый раз монополия в рентгеновской кристаллографии белков изоморфного замещения была нарушена в 1981 г., когда У. Хендриксону и М. Титеру удалось установить атомную трехмерную структуру крамбина по дифракционной картине одного кристаллического образца [553]. Проблема фаз была решена методом МАД при использовании трех длин волн синхротронного излучения и аномального рассеяния атомов серы остатков метионина, входящих в аминокислотную последовательность белка. Стало очевидно, что синхротронная радиация может сделать МАД мощным инструментом исследования структуры белков. Не в полной мере, однако, удовлетворяло использование серы в качестве аномально рассеивающего центра. Дисперсионный и абсорбционный компоненты (f' , f'') фактора аномального рассеяния серы значительно уступают величине нормального компонента структурного фактора и во много раз меньше соответствующих величин компонентов аномального рассеяния более тяжелых атомов. Поэтому в последующем рентгеноструктурном анализе белков с помощью МАД от использования серы как аномально рассеивающего центра пришлось отказаться. Объектами исследования стали белки, содержащие в нативном состоянии атомы металлов (Fe, Zn, Cu и др.), и изоморфные тяжелоатомные производные белков, как в методе МИЗ. Вслед за крамбином, используя аномальное рассеяние, были расшифрованы структуры парвальбумина [554], гемоглобина [555, 556], ферроксина и селенобиотинилстрептавидина [556], а также селенолантаниона [557].

Приобретенный опыт работы с МАД позволил Хендриксону и соавт. усовершенствовать многие экспериментальные и математические процедуры резонансного метода [558]. Были разработаны специальные подходы к оптимизации величины сигнала, уменьшению систематических ошибок, нахождению факторов аномального рассеяния и оценке способом наименьших квадратов получаемых данных.

В результате фазы стали рассчитываться с помощью МАД столь же точно, как и при мультиплетном изоморфном замещении. Решение на основе эффекта аномального рассеяния проблемы фаз приобрело универсальную методологическую форму, приложимую к любым кристаллическим белковым образцам, содержащим аномально рассеивающие центры. Общий характер имеет также предложенный Хендриксоном и сотр. способ введения в белки необходимых при использовании МАД дифракционных решеток [559].

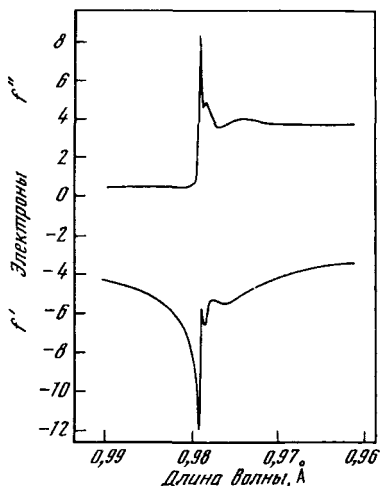
Точность результатов рентгеноструктурного анализа с МАД, как и МИЗ, очевидно, будет тем выше, чем совершеннее изоморфизм у производных белка с резонансными центрами в первом случае и тяжелыми атомами во втором. Ситуация в этом отношении более предпочтительна при аномальном рассеянии, поскольку здесь все необходимые для установления трехмерной структуры белковой молекулы данные можно получить при облучении несколькими длинами волн одного кристалла. Для реализации такого преимущества был необходим метод, который гарантировал бы сведение к минимуму вероятности нарушения изоморфизма при использовании *in situ* резонансных меток, был бы достаточно прост и мог бы применяться в рентгеноструктурном анализе любых белков. Весьма близок к удовлетворению этих требований метод приготовления селенометиониновых белковых препаратов, дающих аномальное рассеяние, который разработали Хендриксон и соавт. [559].

В 1957 г. Д. Кови и Г. Коэн обнаружили, что ауксотрофные клетки *E. coli*, утратившие способность синтезировать метионин, могут успешно развиваться и давать не менее ста поколений при добавлении в питательную среду селенометионина [560]. Тем самым было показано, что необходимые для поддержания жизни *E. coli* белки, в которых все остатки Met заменены на Se-Met, продолжают функционировать нормально. Позже эти результаты были подтверждены Д. Ле Мастером, который целенаправленно создал ауксотрофный для метионина клон путем повреждения MetA гена [561]. Появилась возможность производить синтез аминокислотных последовательностей *E. coli*, в которых на всех местах, где положено быть остаткам Met, находятся остатки Se-Met. Развивая это направление, Хендриксон и соавт. [559] разработали метод встраивания остатков Se-Met в рекомбинантные белки, продуцированные плазмидами *E. coli*. Предшествующие исследования авторов пространственного строения молекул селенолантионина [557] и селенобиотинилстрептавидина [556] с применением МАД-фазирования показали, что атом Se является эффективным центром аномального рассеяния. Поэтому можно сказать, что предложенный метод встраивания остатков селенометионина в положения метионина станет универсальным подходом для белков, особенно тех, которые не содержат в своем нативном состоянии естественных резонаторов.

Авторы метода использовали его для получения двух тиоредоксинов клеток T4 и *E. coli* со стопроцентной заменой метионина на селенометионин. Кристаллы [Se-Met]-замещенных тиоредоксинов оказались полностью изоморфными природным рекомбинантным белкам. Дифрак-

Р и с. 1.43. Факторы аномального рассеяния f' , f'' кристалла селенометионинового тиоредоксина *E. coli*, измеренные вблизи края поглощения селена

Электрический вектор E синхротронного рентгеновского излучения параллелен оси в кристалле



ционные измерения выполнены при трех отобранных длинах волн синхротронной радиации. Одна длина волны соответствовала минимальной энергии аномального рассеяния ($f'_{\min}$), вторая максимальной энергии поглощения ($f''_{\max}$), а третья длина волны находилась вдали от полосы электронного перехода атома Se и, следовательно, отвечала фактору нормального рассеяния (f^0). На рис. 1.43 приведены зависимости факторов аномального рассеяния f' и f'' от облучаемой длины волны, полученные при одной ориентации кристалла [Se-Met]-тиоредоксина *E. coli*. Высокая чувствительность f' и f'' к изменению длины волны в области 0,98 Å и четко выраженный краевой эффект указывают на большие возможности метода МАД в решении фазовой проблемы. Первоначально фазы находятся для нескольких аномально рассеивающих центров, а затем на этой основе — для всех неводородных атомов белка [562].

Таким образом, к началу 1990-х годов внутренние проблемы метода мультидлинноволновой аномальной дифракции были в основном решены. Он обрел форму, требуемую для его широкого применения в рентгеноструктурном анализе белков. Метод МАД имел прочный теоретический фундамент, был детально разработан в экспериментальном и препаративном отношении, оснащен всеми программами, необходимыми для обработки дифракционных данных, построения карт электронной плотности и расчета координат атомов пространственной структуры белковой молекулы. К этому времени его уровень в научно-методологическом плане, приборном обеспечении, степени математического формализма, разрешающей способности и надежности результатов оказался не ниже уровня метода мультиплетного изоморфного замещения тяжелыми атомами. Тем самым более очевидными выступили преимущества МАД, хотя по ряду причин, но главным образом в силу инерции, используемый десятилетиями метод МИЗ не скоро уступит свое место.

Быстрое признание нашел метод Хендриксона в синтезе селенометиониновых производных белков. В работах последних лет кристаллы таких белков часто служат для получения дифракционных картин одновременно от аномального рассеяния, используя при этом резонансные длины волн, и от нормального рассеяния, рассматривая селен как тяжелый атом. Именно такой является работа В. Рамакришнана и соавт., в которой определена с разрешением $2,5 \text{ \AA}$ трехмерная структура глобулярного домена линкерного гистона H5 [512], [Se-Met]-производное домена синтезировано методами генной инженерии. Выращенные из него кристаллы полностью изоморфны кристаллам нативного белка. Для фазирования применены методы МАД и МИЗ. Авторы отметили, что обработка данных, выполненная традиционным способом в комбинации с недавно предложенной процедурой уточнения параметров тяжелых атомов, названной методом максимальной вероятности, или максимального подобия [563, 564], привела к более предпочтительным картам электронной плотности, чем способ Хендриксона и соавт., за которым закрепилось название алгебраического метода [558].

М. Ньюмен и соавт. [565] с разрешением $1,95 \text{ \AA}$ установили кристаллическую структуру рестрикционной эндонуклеазы BamH1, состоящей из 213 аминокислотных остатков. Авторы обратились к использованию селенометионинового варианта после того, как безрезультатными оказались попытки интерпретировать карту Паттерсона, которая была построена по данным, измеренным для нескольких белковых производных тяжелых атомов. [Se-Met]-эндонуклеаза экспрессирована в ауксотрофных клетках *E. coli*, выращенных в среде, включающей наряду с 19 стандартными аминокислотами селенометионин вместо метионина [559]. Полученный таким образом объект исследования не отличался своей активностью от нативного фермента, а его кристаллы были полностью изоморфны кристаллическому состоянию последнего. Методологическая новизна этой работы заключается в том, что установление пространственной структуры эндонуклеазы осуществлено путем комбинации фазовой информации, заключенной в данных аномальной дифракции, полученной методом максимальной вероятности и алгебраическим методом [558, 563, 564]. И тот, и другой приводят приблизительно к одинаковым фазовым ошибкам по отношению к фазам уточненной модели. Авторы полагают, что усредненные фазы значительно ближе к истине, чем полученные одним из методов. Кристаллы [Se-Met]-BamH1 при температуре 5° облучались тремя длинами волн, отвечающих краю ($0,979 \text{ \AA}$) поглощения Se и удаленной области спектра ($0,900 \text{ \AA}$).

Гонадотропин зародыша человека, структура которого была определена Хендриксоном и соавт., является гликопротеиновым гормоном плаценты (237 аминокислотных остатков), стимулирующим секрецию поддерживающего беременность стероидного гормона прогестерона [566]. Как рекомбинантный [Se-Met]-белок, он был синтезирован в клетках яичника хомяка. Этот несколько неожиданный факт свидетельствует, что эукариотические клетки млекопитающих могут быть столь же высоко толерантны, как и прокариотические клетки *E. coli*, к пол-

ному замещению метионина на селенометионин. Уровень замещения в данной работе составил 92%. Структура гонадотропина после частичного дегликозилирования идентифицирована с разрешением 2,6 Å. Использовались дифракционные данные, полученные методом МАД. Кристаллический образец облучался четырьмя длинами волн синхротронной радиации. Две из них (~ 0,98 Å) находились на краю и пике поглощения Se, а две другие в стороне от полосы поглощения. Для каждой длины волны были получены ориентировочные значения дисперсионной (f') и абсорбционной (f'') компонент аномального рассеяния.

В работе Дж. Смит и соавт. метод МАД использован для определения пространственной структуры регуляторного аллостерического фермента глутамин-5-фосфорибозил-1-пирофосфат (PRPP)-аминотрансферазы [567]. Белок состоит из 465 аминокислотных остатков и атома Fe, который является аномально рассеивающим центром при облучении тремя длинами волн (1,7425, 1,7390 и 1,5000 Å) синхротронного излучения. В кристалле PRPP-аминотрансфераза обнаружена в виде гомотетрамера (молекулярная масса ~200 кДа). В предшествующих рентгеноструктурных анализах с применением метода аномальной дифракции объектами исследования были белки, молекулярные массы которых не превышали 30 кДа. Данная работа свидетельствует о больших возможностях МАД в определении трехмерных структур громоздких белковых комплексов.

* * *

Рассмотренные в этой главе исследования, по-видимому, не оставляют сомнений в том, что в 1990-е годы рентгеноструктурный анализ белков, по-прежнему сохраняя высокий темп экстенсивного развития, приступил к решению принципиально новых задач, представляющих первостепенный интерес для молекулярной биологии. Основная, если не единственная, причина наметившегося качественного изменения возможностей кристаллографии макромолекул связана с использованием синхротронной радиации. Переход к новому источнику рентгеновского излучения, во-первых, ослабляет требования, предъявляемые к размерам кристаллов, что особенно важно в структурном анализе высокомолекулярных белков и их комплексов, имеющих крупные элементарные ячейки. Во-вторых, сплошной спектр синхротронной радиации и легкость выбора любой длины волны монохроматического излучения дали возможность по-новому подойти к решению фазовой проблемы и разработать метод мультидлинноволновой аномальной дифракции, требующий для фазирования одного кристаллического образца. Существенным дополнением метода МАД стал способ рекомбинантного получения в ауксотрофных клетках белков, в аминокислотных последовательностях которых все остатки метионина заменены на селенометионин. Использование [Se-Met] белков не только освобождает рентгеноструктурный анализ от длительной рутинной процедуры приготовления нескольких изоморфных белковых производных тяжелых атомов, но практически снимает саму проблему изоморфизма.

И наконец, в-третьих, самое важное, применение в кристаллографии белков синхротронной радиации, несравненно более мощной, чем излучение рентгеновской трубки, снижает по крайней мере на два-три порядка время экспозиции. Значение этого факта трудно переоценить, так как становятся доступными для установления трехмерных структур на атомном уровне промежуточные соединения процессов жизнедеятельности. Если до недавнего времени рентгеноструктурный анализ являлся фактически единственным прямым методом исследования нативных конформаций белковых молекул с атомным разрешением, то сейчас он становится источником (также единственным) столь же детальной информации о пространственном строении промежуточных соединений.

Таким образом, ближайшие перспективы развития рентгеноструктурного анализа белков будут определяться достижениями в использовании синхротронной радиации в трех отмеченных направлениях: синтезе и кристаллизации белков, а также условиях проведения эксперимента. Продолжится наметившееся сближение рентгеноструктурного анализа белка с методами малоуглового рассеяния, флюоресценции, криомикроскопии, лазерной, ЯМР- и УФ-спектроскопии и т.д. Сделанные прогнозы касаются кумулятивного развития кристаллографии белка и, следовательно, говорят о его тактических целях. Что же касается стратегического прогноза, то он не может быть известен, поскольку развитие науки, являясь нелинейным неравновесным процессом, не имеет конечной цели и непредсказуемо в принципе.

Глава 5

НЕЙТРОННАЯ КРИСТАЛЛОГРАФИЯ БЕЛКОВ

Два десятилетия (1960—1970-е годы) рентгеноструктурный анализ был единственным методом прямого исследования пространственного строения белков. Его роль и сейчас остается доминирующей. Однако в начале 1980-х годов появились новые методы, дополняющие рентгеноструктурный анализ. Они основаны на применении в кристаллографии белков дифракции нейтронов и гамма-лучей. Эти методы сходны с рентгеноструктурным анализом прежде всего использованием одного и того же состояния исследуемого образца — это также белковый монокристалл и изучаемым явлением — дифракцией, но дифракцией уже других излучений. Явления, происходящие во взаимодействии атомов, упорядоченных в кристаллической решетке молекул белков, с нейтронами и гамма-излучением, сильно отличаются друг от друга и от того, что имеет место при взаимодействии атомов с рентгеновским излучением. Поэтому получаемые от трех методов дифракционные картины не полностью совпадают между собой, а дополняют друг друга, раскрывая новые свойства белковых молекул. Рентгеновские лучи рассеиваются электронной плотностью. Рассеивающая

способность разных атомов существенно различается: у атомов водорода она в десятки раз меньше, чем у атомов углерода, азота, кислорода, в сотни раз меньше, чем у атомов фосфора, серы, хлора и в тысячи раз, чем у тяжелых атомов (платины, золота, ртути, урана). Поэтому в рентгеноструктурном анализе даже при высоком разрешении практически нельзя определить координаты атомов водорода, которые составляют около половины всех атомов белковой молекулы.

Нейтроны рассеиваются ядрами атомов, т.е. совершенно иным образом. Размеры ядер, причем ядер всех элементов, чрезвычайно

Т а б л и ц а 1.12

Рассеяние нейтронов различными атомами

АТОМ	$b \cdot 10^{-13}, \text{см}$	АТОМ	$b \cdot 10^{-13}, \text{см}$
H	-3,74	O	5,80
D	6,67	S	2,80
C	6,65	Ca	4,70
N	9,40		

малы по сравнению с длиной волны нейтрона (используют потоки нейтронов с длиной волны, соизмеримой с длиной валентных связей), поэтому все атомы рассеивают нейтроны примерно одинаково. В табл. 1.12 приведены данные о рассеянии нейтронов, полученные для различных атомов [рассеивающая способность охарактеризована амплитудой рассеяния (b), которая в зависимости от спина ядра, если он не равен нулю, может иметь два значения (b^+ и b^-)].

Атомы водорода, не поддающиеся локализации при использовании метода рентгеноструктурного анализа, могут быть легко привнесены в найденную трехмерную структуру белка с помощью хорошо известных стереохимических правил. Такая процедура проводится автоматически на ЭВМ. Однако есть случаи, когда знание положений атомов водорода в молекулярной структуре имеет принципиальное значение и должно быть получено опытным путем. Как правило, это касается активных центров ферментов, где установление конкретных систем водородных связей очень важно, поскольку они играют определенную функциональную роль. В решении подобного вопроса необходимо рентгеноструктурный анализ дополнить изучением дифракции нейтронов. Возможность наблюдать положения водородных атомов значительно расширяет круг решаемых кристаллографией задач. Доступными для изучения становятся некоторые динамические аспекты пространственной организации белков, в частности конформационные флуктуации белковых молекул. В этом отношении одной из перспективных областей применения нейтронной техники является получение качественной информации о процессе замещения водорода на дейтерий, атомы которого по-другому проявляют себя в рассеивании нейтронов.

В 1950-е годы А. Гвидт и К. Линдерстрем-Ланг впервые использовали метод Н/D-замены для изучения конформационной динамики белковых молекул [568]. Он основывался на определении скоростей изотопного обмена протонов амидных групп в нативных белках. Различие в скоростях, достигавшее 8—10 порядков, коррелировалось с доступностью обменивающегося протона, т.е. с положением амидной группы в трехмерной структуре белка. То, что обмен водорода на дейтерий совершался (хотя и медленно) даже у амидных групп, находящихся в центре глобулы и не имеющих непосредственных контактов с окружающей средой, было объяснено конформационной лабильностью белковой молекулы, ее "дыханием".

В последние годы интерес к изучению динамических свойств белков заметно возрос, и нейтронная дифракция может оказаться чрезвычайно ценным методом для получения строго количественной структурной информации. Используемые ранее методы были не в состоянии устанавливать непосредственную связь между скоростью замещения Н/D и положением соответствующих групп в белковой глобуле. Тем самым выводы о механизме конформационных флуктуаций неизбежно носили феноменологический характер, что ограничивало понимание причин, вызывающих это явление. Первый, кто обратил внимание на большие возможности нейтронной дифракции в Н/D-анализе, был Б. Шенборн (1971 г.) [569—571]. В настоящее время с помощью такой техники исследованы процессы замещения амидных водородов в миоглобине, рибонуклеазе, трипсине и крамбине. Это были самые первые работы такого плана. Но они позволили установить новые факты, причем при анализе объектов, которые ранее уже были тщательно изучены другими методами. Например, при исследовании изотопного замещения рибонуклеазы А было обнаружено различное отнесение мест замещения, даваемое нейтронным анализом, химическими методами и использованием тритиевой замены. Установлено, что количественные результаты химического анализа, полученные для рибонуклеазы S, лишенной первых 20 остатков (пептида S), не могут быть перенесены на целый белок — рибонуклеазу А. Особенно интересны данные нейтронной дифракции по Н/D-замене в трипсине, полученные А. Козиаковым [572, 573]. Они противостоят общепринятой трактовке обмена изотопов путем глобального кооперативного развертывания пептидной цепи.

Не менее плодотворна нейтронная дифракция в изучении частично и полностью связанных молекул воды в пограничном слое и внутри белковой глобулы. Детальный анализ структуры водного окружения белка с помощью нейтронов впервые провели Б. Шенборн и Дж. Хенсон [574]. Они обнаружили значительное расхождение в наборах из 40 прочно связанных молекул воды с исследованным ими СО-миоглобином и исследованным Т. Такано метмиоглобином методом рентгеноструктурного анализа [575]. Надежная фиксация положений атомов водорода при нейтронной дифракции делает этот метод уникальным в изучении внутренних вращений вокруг одинарных связей, особенно вращений метильных групп. Из карт нейтронной плотности трипсина следует, что, несмотря на плотную упаковку белковой макромолекулы,

подавляющее большинство метильных групп (свыше 85%) находится в ориентациях, отвечающих минимумам торсионного потенциала.

Рентгеноструктурный анализ усложняется тем, что рентгеновские лучи являются ионизирующим излучением, что приводит при нормальной температуре к быстрому разрушению кристалла. Это обстоятельство требует частой замены экспонируемого образца и введения при обработке опытных данных специальных поправок, ведущих к дополнительным ошибкам.

Нейтроны — незаряженные частицы. В дифракционных экспериментах длина волны нейтронного потока должна быть того же порядка, что и длины валентных связей. В рентгеноструктурном анализе обычно используют медное излучение с $\lambda = 1,54 \text{ \AA}$. Нейтроны с длинами волн такого порядка испускаются при температуре $\sim 100^\circ$ и называются тепловыми. Они имеют значительно более низкую энергию (0,025 эВ) по сравнению с рентгеновским излучением (10 000 эВ) и не разрушают кристаллы белков, поэтому набор дифракционных данных для нейтронов можно получить от одного кристалла, что является несомненным достоинством метода. Недостаток метода нейтронной дифракции — малая интенсивность потока частиц. Распределение скоростей нейтронов, из которого вырезается монохроматический поток, отвечает кривой Максвелла. Интенсивность первичного потока нейтронов по крайней мере на два порядка слабее характеристического излучения рентгеновской трубки. Выше отмечалось, что способность атомов рассеивать нейтроны существенно не зависит от порядкового номера в Периодической системе элементов Менделеева. Поэтому метод изоморфного замещения с использованием тяжелых атомов бесполезен в нейтроноструктурном анализе белков. Альтернативный подход к решению фазовой проблемы еще не найден. В связи с этим для расшифровки нейтронограмм необходимо использовать данные рентгеноструктурного анализа. К настоящему времени с помощью метода нейтронной дифракции в комбинации с рентгеноструктурным анализом получены полные трехмерные структуры следующих пяти белков: трипсина, лизоцима, миоглобина, рибонуклеазы и крамбина (разрешение 2,2; 2,2; 1,4; 2,8 и 1,3 $\text{\AA}$ соответственно; ошибка в определении координат $< 0,3 \text{ \AA}$) [548].

Глава 6

ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ БЕЛКОВ

Одним из методов, позволяющих получать важную структурную информацию, является электронная микроскопия [576]. Этот метод больше других способствовал пониманию клеточной морфологии и структуры клеточных органелл. Возможность получения непосредственного изображения с большим увеличением широко используется почти во всех областях биологии и материаловедения. Однако метод

имеет ряд ограничений, особенно в случае применения его к биологическим объектам. Во-первых, реальное разрешение на биологических объектах обычно не превышает $\sim 15 \text{ \AA}$, хотя предельное разрешение современных электронных микроскопов достигает величины $\sim 2,0 \text{ \AA}$. Во-вторых, при исследовании макромолекул серьезные трудности связаны с контрастностью образцов и их стабильностью в условиях глубокого вакуума и облучения пучком ускоренных электронов³. Кроме того любое электронно-микроскопическое изображение представляет собой двухмерную проекцию трехмерного объекта на плоскость фотопластины.

В последние годы электронная микроскопия молекулярных уровней разрешения бурно развивается. С одной стороны, непрерывно совершенствуется приборная база. Появились микроскопы, позволяющие проводить съемки при низких и сверхнизких температурах, что уменьшает радиационное повреждение биологических объектов. Расширился диапазон ускоряющих напряжений и созданы электронные устройства, минимизирующие облучение образца. С другой стороны, благодаря развитию вычислительной техники появился целый спектр методов цифровой обработки изображений. Применение компьютеров позволяет по-новому подойти к проблеме увеличения контрастности изображений и перейти к трехмерной электронной микроскопии, т.е. синтезированию пространственных изображений исследуемых объектов на основе их проекций.

Яркой демонстрацией возможностей современной электронной микроскопии является установление пространственной структуры бактериородопсина первоначально с разрешением $\sim 7 \text{ \AA}$, а впоследствии $\sim 3 \text{ \AA}$. Это означает, что электронно-микроскопические методы могут в отдельных случаях приближаться по своей информативности к рентгеноструктурному анализу.

6.1. ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ МЕТОДА

Теоретические принципы, лежащие в основе световой микроскопии, справедливы и для электронной, а электронный микроскоп во многих отношениях аналогичен световому. Длина волны электронного пучка зависит от величины ускоряющего напряжения. Так, при 50 кВ она равна $0,054 \text{ \AA}$, а при 1000 кВ — $0,0087 \text{ \AA}$, т.е. короче рентгеновского излучения и поэтому можно было бы ожидать, что такой микроскоп будет давать изображение с большим разрешением по сравнению с рентгеновской дифракцией. Однако по техническим причинам это неосуществимо и лучшие современные электронные микроскопы дают разрешение $\sim 2,0 \text{ \AA}$.

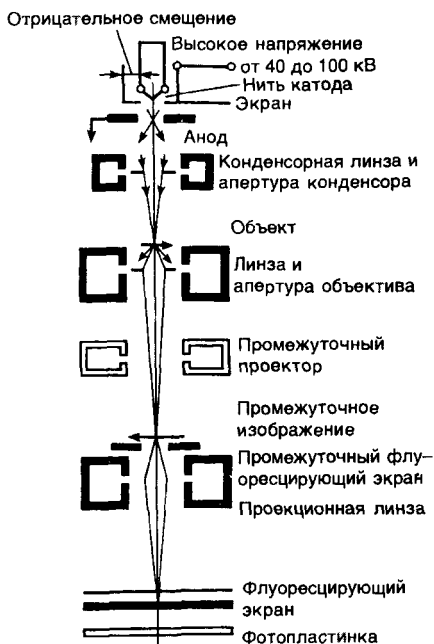
³ Электроны обладают более разрушительным действием по сравнению с рентгеновским излучением. Минимальные дозы облучения, необходимые для регистрации изображения, в тысячи раз превышают дозы рентгеновского излучения, необходимые для регистрации дифракции, например, от белковых кристаллов.

Р и с. 1.44. Расположение электромагнитных линз в электронном микроскопе

Контрастность изображения. Одной из острых проблем электронной микроскопии биологических объектов является контрастность изображений. Нет смысла стремиться к высокому разрешению, если детали изображения нельзя различить из-за низкой контрастности. В обычной просвечивающей электронной микроскопии (рис. 1.44) изображение формируется электронами, упруго рассеянными атомами образца. Если какой-то участок образца содержит скопление тяжелых атомов, часть электронов рассеивается под большими углами, они задерживаются объективной апертурой (диафрагмой) и на флуоресцентном экране такой участок выглядит темным. Та часть образца, которая образована легкими атомами, рассеивает электроны слабо, электроны фокусируются линзой и на изображении этот участок будет, соответственно, светлее. Апертура является важным элементом конструкции микроскопа и играет двоякую роль: она пропускает только те лучи, которые почти параллельны оптической оси и могут быть сфокусированы линзой, и, задерживая электроны, рассеянные под большими углами, увеличивает контрастность изображения. Такой механизм образования контраста называется амплитудным.

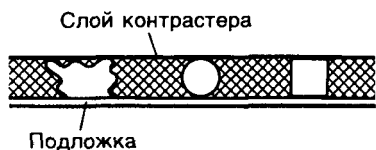
Другой способ увеличения контрастности изображения связан с расфокусировкой изображения — фазовый контраст. На участках образца, имеющих резкое изменение толщины или плотности вещества из-за интерференционных эффектов в условиях расфокусировки изображения, возникают так называемые полосы или кольца Френеля. Если сделать серию снимков, проходя от "недофокусированных" изображений к "перефокусированным", можно легко убедиться, что по обе стороны от "острого" фокуса снимки будут более контрастными. Такой способ увеличения контрастности изображений широко используется на практике. Однако необходимо быть осторожным, так как чрезмерная расфокусировка приводит к потере разрешения и появлению ложных деталей изображения.

Специфика биологических объектов в отношении контрастирования состоит в том, что они в основном построены из легких элементов и для микроскопирования помещаются на тонкие угольные или полимерные пленки. Различие в рассеивающей способности образца и пленки под-



ложки мало, и, следовательно, контраст изображения низок. Поэтому чаще всего биологические объекты приходится окрашивать красителями, содержащими соли тяжелых металлов. Окрашивание неизбежно приводит к значительному снижению разрешения, а также, по-видимому, и к некоторому изменению структуры объектов. Для окрашивания или контрастирования биологических объектов разработано много методов.

При изучении макромолекул и надмолекулярных образований часто применяют так называемое негативное контрастирование, при котором исследуемые частицы заключают в тонкий слой электронно-плотного



Р и с. I.45. Негативное контрастирование

вещества. Такое контрастирование называют негативным, поскольку электронно-плотное вещество не "окрашивает" объект, а заполняет пустоты и контрастирует его границы (рис. I.45). Это название, разумеется, условно, ибо всегда происходит и позитивное прокрашивание и необходимо выбрать методику так, чтобы упомянутый эффект был минимальным. В качестве контрастеров часто применяют соли урана и фосфовольфрамовую кислоту. Описанная выше процедура преследует две цели: увеличение контрастности изображения и предотвращение разрушения образца при бомбардировке электронами. В сущности при микроскопировании исследуются не сами биологические структуры, а "слепок" с них. При негативном контрастировании фактически изучаются особенности распределения контрастирующего вещества, обусловленные структурой объекта. Поэтому в изображении объектов существенный вклад могут вносить особенности распределения контраста, собственная структура контрастирующего вещества (аналогично зернистости эмульсии фотоснимка), ограничивающая предельное разрешение, и искажения структуры. Понимание особенностей методики подготовки образца, как процесса "отображения" структуры, необходимо для правильной интерпретации электронно-микроскопических изображений.

Трехмерная электронная микроскопия. Любое изображение, полученное с помощью просвечивающей электронной микроскопии, представляет собой двухмерную проекцию структуры трехмерного объекта на плоскость. Поэтому такое изображение не содержит всей информации о трехмерной структуре. Вместе с тем, если иметь серию подобных проекций, полученных при съемке образца под разными углами, например, наклоном его относительно оптической оси микроскопа, можно достаточно полно представить пространственную структуру объекта. В принципе эта процедура аналогична рассматриванию любого предмета с разных углов зрения. Задачей трехмерной электронной микроскопии является реконструкция пространственной структуры

на основе набора двумерных проекций, полученных при съемке объекта под разными углами. Метод реконструкции может быть основан на хорошо знакомой из кристаллографии теореме проектирования, согласно которой двумерная Фурье-трансформанта трехмерного распределения плотности (т.е. объекта) идентична центральному сечению трехмерной трансформанты, нормальному к направлению проектирования. Поэтому трехмерную Фурье-трансформанту объекта строят последовательно сечение за сечением, используя преобразования для различных направлений проектирования. Другими словами, применяя Фурье-трансформанты проекций, снятых под разными углами, можно построить трехмерную трансформанту объекта. Реконструкцию трехмерной структуры объекта получают повторным преобразованием Фурье-трансформанты подобно тому, как это делается при расчете трехмерной структуры в рентгеновской кристаллографии. Принципиальное отличие состоит лишь в том, что экспериментальными данными здесь являются не дифракционные картины, а изображения. Трансформанты изображений (проекций) получают путем математической операции двухмерного преобразования Фурье, в результате которого рассчитываются не только амплитуды, но и фазы структурных факторов. Поэтому для реконструкции трехмерной структуры задачи решения фазовой проблемы не возникает⁴.

Описанный подход к реконструкции трехмерной структуры требует превращения изображений в цифровую форму — двумерную карту распределения оптической плотности и его последующего цифрового "процессинга", например, преобразования Фурье с помощью ЭВМ. Начало развитию методов трехмерной электронной микроскопии было положено работой Д. Де-Розира и А. Клуга [577, 578], которые впервые применили цифровой процессинг изображений для изучения пространственной структуры бактериофага Т4. То обстоятельство, что благодаря высокой степени симметрии объекта многие наклонные проекции оказались идентичными, позволило рассчитать его структуру на основании единственного электронно-микроскопического снимка⁵. Для менее симметричных структур требуется большее количество проекций. Так, в случае экосаэдрических вирусов тем же авторам понадобилось объединить информацию, содержащуюся в трех снимках [579]. Большинство объектов исследования не обладает высокой собственной симметрией. Поэтому для реконструкции трехмерной структуры приходится собирать большие наборы их изображений, снятых с помощью электронного микроскопа в максимально широком диапазоне углов.

⁴ В том смысле, что экспериментальные данные уже содержат информацию о фазах. Однако проблема правильного и точного определения параметров существует всегда.

⁵ Для иллюстрации идентичности проекций симметричных объектов можно рассмотреть предельный случай симметричности — шар, любые проекции которого идентичны друг другу.

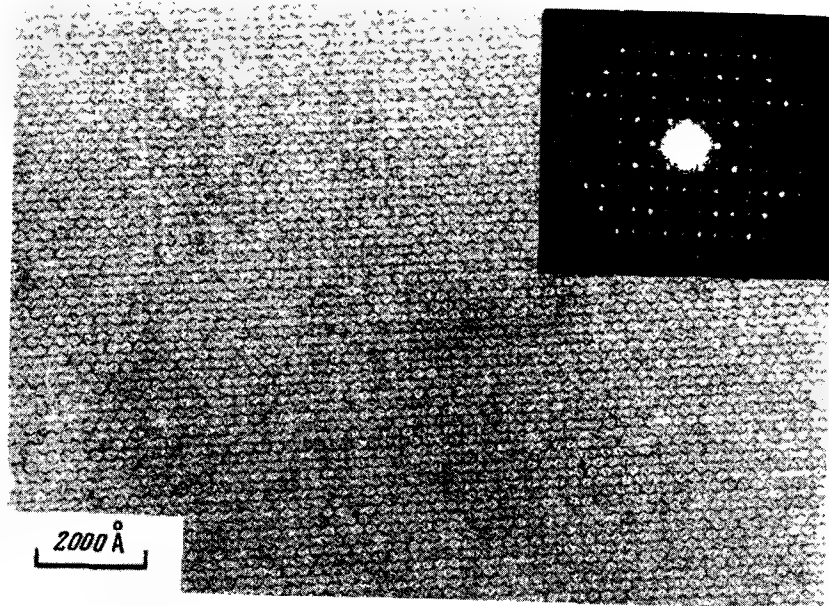
6.2. ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ ПЕРИОДИЧЕСКИХ СТРУКТУР

Обычно электронно-микроскопические изображения характеризуются высокой степенью "зашумленности". Поэтому одинаковые проекции структуры молекул отличаются друг от друга различным прокрашиванием, зернистостью пленки-подложки, частичным искажением структуры и т.п. Для получения достоверной проекции необходимо усреднить многие изображения молекул, находящихся в одинаковой ориентации. Идеальной в этом отношении является микрофотография регулярно построенного объекта, например, двухмерного кристалла белка, которая содержит фактически много изображений одного и того же повторяющегося элемента (рис. I.46). Главное отличие такого кристалла от обычного трехмерного состоит в том, что его толщина в направлении, перпендикулярном изображению, равна высоте образующих его молекул, т.е. одной элементарной ячейки.

Для получения усредненного профильтрованного от шумов изображения иногда используют оптический дифрактометр (рис. I.47). Благодаря периодической структуре объекта вся полезная информация о нем содержится в регулярно расположенных дифракционных максимумах. Нерегулярная часть структуры образца — шум — дает дифракционные максимумы, располагающиеся вне узлов решетки. Можно "отфильтровать" шумовую составляющую исходного изображения, используя для формирования изображения только лучи, проходящие через узлы решетки, поместив в плоскость дифракционной картины "маску" — непрозрачный перфорированный экран, пропускающий только эти лучи.

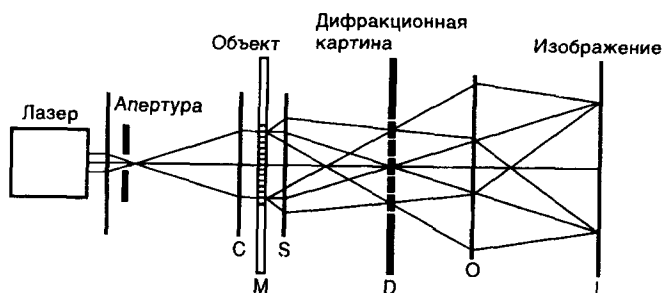
Оптическая фильтрация легко осуществима на практике. Главное ограничение здесь качество перфорированного экрана. "Шумовые" максимумы дифракции иногда располагаются очень близко от основных и поэтому их перекрывание "маской" на практике оказывается невозможным. Наиболее эффективно отфильтровывают изображения периодических объектов с помощью ЭВМ [580]. Для этого участок изображения, используя денситометр, переводят в цифровую форму, превращая его в двухмерный набор оптических плотностей. Затем с помощью преобразования Фурье рассчитывают дифракционную картину от выбранного участка изображения. Как уже отмечалось выше, такой расчет дает как амплитуды, так и фазы дифрагированных лучей. Ее анализ позволяет выбрать наиболее интенсивные и регулярно расположенные максимумы, опираясь на которые можно определить параметры дифракционной решетки и произвести индексирование расположенных в ее узлах максимумов, т.е. приписать им соответствующие индексы Миллера — h и k ⁶. Для проведения качественной фильтрации надо детально (рис. I.48) проанализировать выбранные дифракционные максимумы, что делают с помощью так называемых

⁶ В данном случае третий индекс — l равен нулю, так как дифракция получена от плоской решетки.



Р и с. I.46. Микрофотография участка высокоупорядоченного двухмерного кристалла цитохром-с-редуктазы и картина оптической дифракции (на вставке в углу)

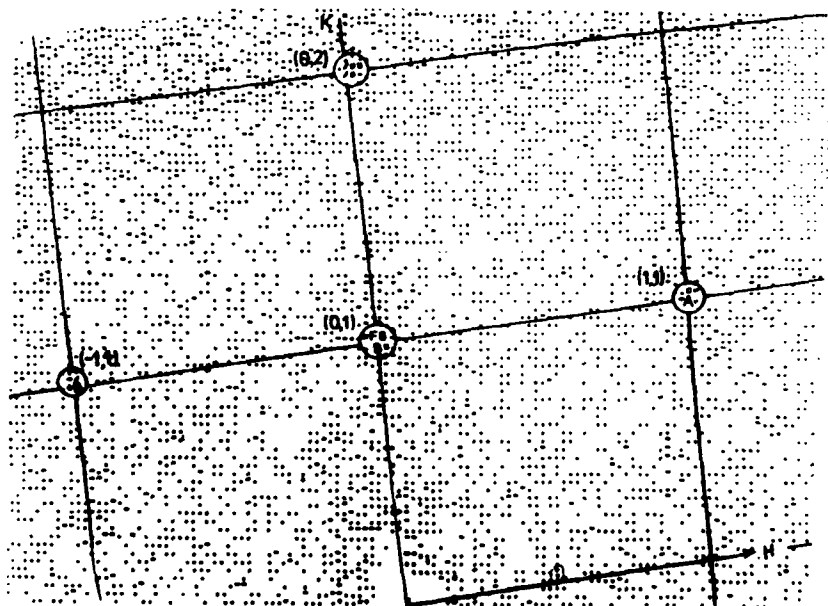
Негативное контрастирование 1%-ным водным раствором уранилацетата. Калибровка — 0,1 мкм



Р и с. I.47. Схема оптического дифрактометра

С, О, S — линзы; М — микрофотография; D — плоскость дифракционной картины; I — плоскость изображения

амплитудных и фазовых спектров (рис. I.49), которые в цифровой форме подробно показывают распределение таких величин в районах узлов обратной решетки. Анализ спектров позволяет определить положение центров максимума (и, следовательно, уточнить параметры элементарной ячейки кристаллов), их форму и рассчитать величины амплитуд и фаз (структурных факторов). Используя полученные структурные факторы для повторного преобразования Фурье, рассчитывают



Р и с. 1.48. Дифракционная картина, рассчитанная на ЭВМ с помощью преобразования Фурье, участка изображения двумерного кристалла Na^+ , K^+ -АТРазы

Символы (.,+/-A,B и др.) обозначают разные интенсивности дифрагированных лучей в соответствующих точках обратного пространства. Сплошные линии — обратная решетка, проведенная через более интенсивные дифракционные максимумы. Цифры в углах решетки — индексы Миллера (h и k)

профильтрованное изображение исходного кристалла, содержащее информацию только о периодической составляющей объекта (рис. 1.50).

Поскольку в каждом дифракционном максимуме содержится информация о всех элементах структуры изображения, фильтрация дает изображение одной элементарной ячейки кристалла, усредненное по всем ячейкам исходного непрофильтрованного изображения. Таким образом, статистическая достоверность изображения молекулы достигается автоматически в результате фильтрации благодаря кристаллической природе объекта. Поскольку такие изображения представляют собой проекции трехмерной структуры белков на плоскость, то уже на этом этапе исследования можно сделать некоторые заключения о пространственной организации объекта.

Двухмерная кристаллизация белков и проекционная структура кристаллов. Основная трудность в реализации описанного выше подхода состоит в том, что чрезвычайно редко белки *in vivo* существуют и функционируют в мембранах в виде двухмерных кристаллов. Обычно белок необходимо выделить из клетки, очистить до гомогенного состояния и сформировать из него двухмерный кристалл [581]. В подавляющем большинстве случаев двухмерной кристаллизации подвергают

x	10	11	12	13	14	15	16	17	18
y									
32	162	345	179	170	90	57	179	78	42
33	95	239	253	320	225	211	176	61	84
34	166	140	181	139	367	173	128	190	98
35	89	156	282	254	509	495	91	282	191
36	105	59	174	92	1164	393	242	236	130
37	121	119	188	322	443	360	49	210	124
38	109	174	25	126	422	398	193	41	144
39	16	58	141	152	113	280	125	122	287
40	164	105	128	48	53	152	132	216	219

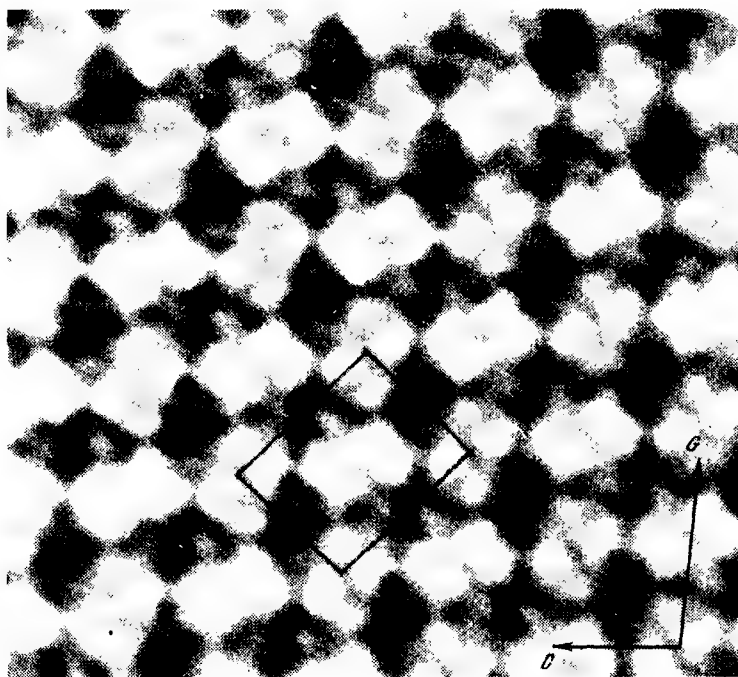
x	10	11	12	13	14	15	16	17	18
y									
32	1	26	22	2	34	17	27	11	33
33	34	2	24	11	30	33	35	6	17
34	31	3	34	5	12	22	17	26	36
35	1	10	35	32	31	1	35	33	14
36	4	15	35	3	25	32	9	33	15
37	9	31	13	23	29	18	22	19	12
38	18	0	16	12	35	5	24	10	23
39	24	24	25	12	11	3	24	34	5
40	26	20	28	17	3	35	1	22	8

Р и с. 1.49. Амплитудный (вверху) и фазовый (внизу) спектры участка дифракционной карты вблизи максимума (0,1) на рис 1.48

Верхняя горизонтальная строка x и левый столбик цифр y — координаты обратного пространства. Центр дифракционного максимума обведен кругом, цифры внутри прямоугольников — распределение интенсивностей и фазовых углов дифрагированных лучей в непосредственной близости от центров максимумов

интегральные мембранные белки. Такие кристаллы могут формироваться либо в "нативном" липидном окружении, либо после (в ходе) их реконструкции в липидные бислои подходящего состава.

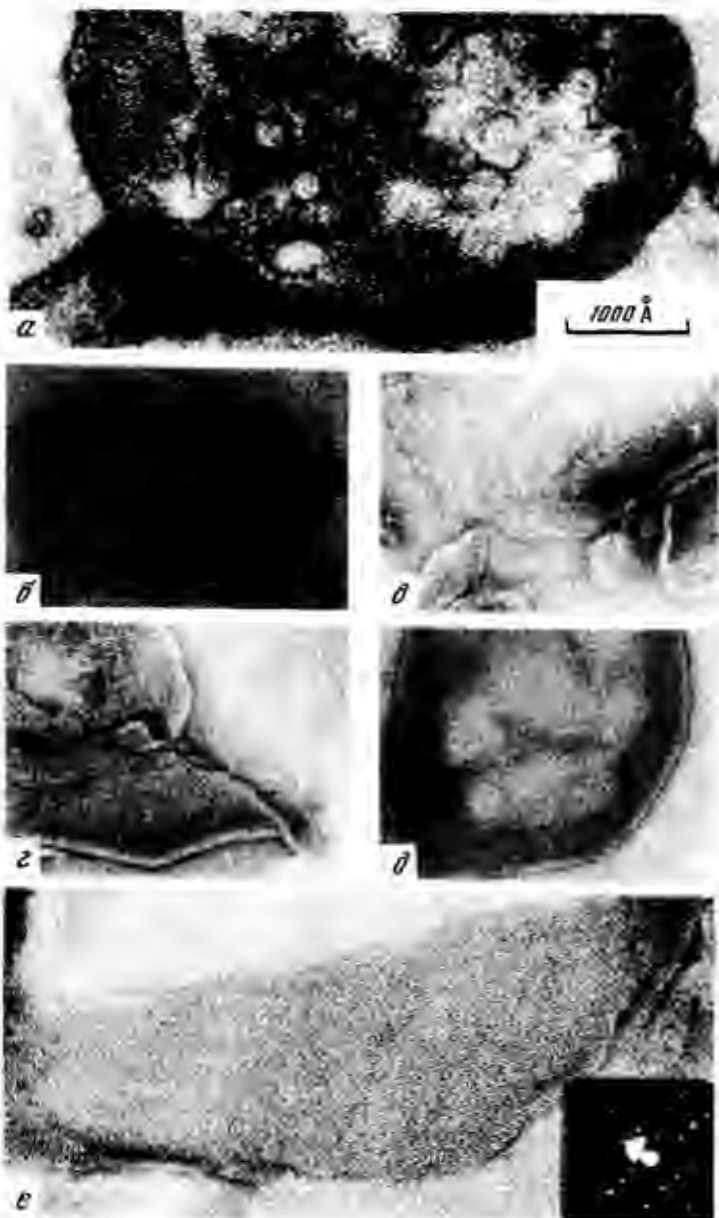
Кристаллизация мембранных белков может быть реализована в том случае, когда белок удастся очистить до гомогенного состояния без солюбилизации содержащих его мембран в детергентах. Именно к таким белкам относится Na^+ , K^+ -АТРаза наружного мозгового слоя почек млекопитающих, в частности свиньи. Этот фермент, являющийся натриевым насосом клетки и обеспечивающий создание транс-мембранного градиента концентраций ионов натрия и калия, состоит из двух типов субъединиц α и β , присутствующих в эквимольных коли-



Р и с. I.50. Проекционная структура двухмерного кристалла цитохром-с-редуктазы, полученная Фурье-фильтрацией участка изображения, аналогичного приведенному на рис. I.46

чествах. Молекулярные массы α - и β -субъединиц составляют 112 и 45 кДа соответственно [582].

При электронном микроскопировании мембранных фрагментов, содержащих очищенную Na^+ , K^+ -АТФазу, последняя выявляется в виде хаотично расположенных на поверхности мембран глобулярных частиц. Часто из-за эффектов латеральной диффузии происходит агрегация этих частиц и определенные участки мембраны содержат плотно упакованные молекулы (рис. I.51). Такая агрегация частиц может быть инициирована внешним воздействием, например, инкубацией мембран при пониженной температуре [583]. В определенных условиях агрегация частиц имеет упорядоченный характер: наблюдается образование цепочек, ассоциация их между собой и формирование микрокристаллических областей. Для формирования двухмерных кристаллов большей площади необходимо тщательно оптимизировать условия кристаллизационного эксперимента. Na^+ , K^+ -АТФаза относится к так называемым E_1E_2 -ферментам, т.е. может находиться в двух конформационных состояниях. Для кристаллизации необходимо стабилизировать белок в одной из этих конформаций, что достигается добавлением в среду инкубации соответствующих лигандов. Известно, что анионы ванадиевой и фосфорной кислот стабилизируют Na^+ , K^+ -АТФазу в кон-



Р и с. I.51. Микрофотографии мембранных фрагментов Na^+ , K^+ -АТФазы

a — агрегированные молекулы; *b*–*d* — агрегация молекул с образованием цепочек, рядов и кристаллических областей небольшого размера; *e* — двумерный кристалл и оптическая дифракция от выбранного участка изображения

формации E₂. Этому эффекту способствует присутствие ионов калия в высокой концентрации.

Агрегация белковых частиц, индуцируемая снижением температуры, обусловлена, по-видимому, эффектом разделения фаз, связанным с переходом липидной фазы мембран из жидкокристаллического состояния в твердое. В подходящей среде кристаллы могут формироваться при инкубации мембран при пониженной температуре до нескольких градусов в течение 1—4 недель [583]. Оказалось, что качество кристаллов зависит не только от температуры и времени инкубации, но и скорости ее достижения. Наиболее эффективно "равновесное" охлаждение, при котором температура суспензии снижается от 37 до 0° в течение нескольких недель [584].

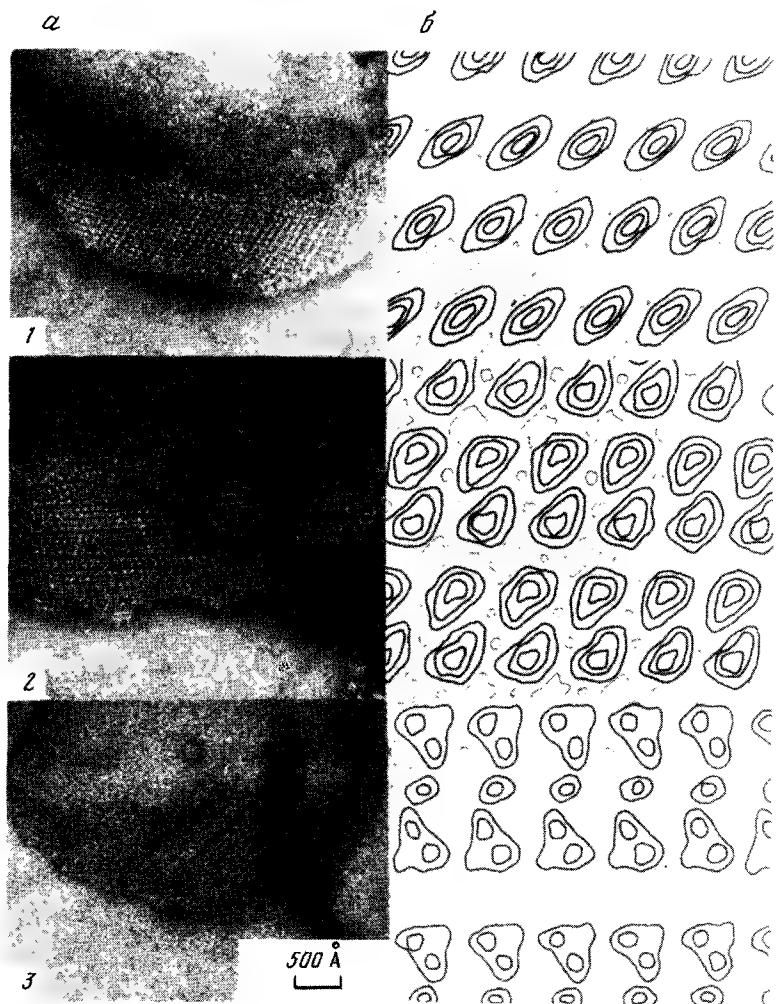
Т а б л и ц а I.13

Условия кристаллизации и температурная стабильность двухмерных кристаллов Na⁺, K⁺-АТРазы

Кристаллическая форма	Лигаид	KCl, mM	Температура*, °C
1	-VO ₃ ⁻	0—150	0—6
2	-PO ₄ ³⁻	100	0—3
3	-PO ₄ ³⁻	0	0—7

*Указан диапазон температур, при которых не происходит ухудшения качества кристаллов в течение 2 недель.

В условиях, близких к оптимальным, содержание кристаллов может достигать до 50% от общего количества мембранных фрагментов, а их размер достигать 0,5 мкм. Оптимальные условия образования двухмерных кристаллов Na⁺, K⁺-АТРазы и их температурной стабильности приведены в табл. I.13. Сопоставление электронных микрофотографий кристаллов, а также картин оптических дифракций и их профильтрованных изображений, показывает, что Na⁺, K⁺-АТРаза может кристаллизироваться в трех различных формах (рис. I.52). Кристаллографические параметры элементарных ячеек кристаллов представлены в табл. I.14. Минимальный размер элементарной ячейки характерен для кристаллов формы 1. На профильтрованных изображениях таких кристаллов видно, что элементарная ячейка содержит один пик плотности и образована, по-видимому, одним протомером (т.е. парой α, β-субъединиц). Для двух других форм (2 и 3) характерно наличие двух основных максимумов плотности на одну элементарную ячейку кристалла. Площадь каждого из них соответствует площади, характерной для формы 1. Поэтому их элементарные ячейки образованы, по-видимому, парой α, β-протомеров. Значение фаз дифракционных максимумов для кристаллов формы 2 и 3 близки к 0 или 180° (стандартное отклонение при уточнении фазового центра не превышало 17°), а на профильтрованных изображениях отчетливо прослеживается наличие поворотной



Р и с. 1.52. Микрофотографии (а) и их профильтрованные изображения (б) трех форм двухмерных кристаллов Na^+ , K^+ -АТРазы (1, 2, 3 соответственно)

оси второго порядка, перпендикулярной плоскости мембраны. Это дает основание отнести такие кристаллы к двухсторонней группе симметрии $p21$. Элементарная ячейка кристаллов формы 1 лишена дополнительных элементов симметрии, а фазы дифракционных максимумов имеют произвольные значения в диапазоне $0-360^\circ$. Поэтому подобные кристаллы характеризуются низшей из возможных симметрий — $p1$.

Аналогичное исследование было проведено также для β -субъединицы Na^+ , K^+ -АТРазы [585]. β -Субъединица, как и сам фермент, может быть также получена в виде изолированных мембранных фрагментов. Двухмерные кристаллы формировались при медленном ($0.1^\circ/\text{ч}$) ох-

лаждении таких мембран от 37 до 4° в среде, содержащей ионы Mg^{2+} или Ca^{2+} . Следует отметить, что для кристаллизации β -субъединицы присутствие ионов VO_3^- необязательно. Кроме того, эти кристаллы характеризуются большей температурной устойчивостью по сравнению с полным ферментом. По данным оптической дифракции и Фурье-анализа разрешение на микрофотографиях достигает 20 Å. Профильтрованные изображения двух кристаллических форм, полученных в присутствии ионов Mg^{2+} и Ca^{2+} , представлены на рис. I.53. Элементарные ячейки обоих типов кристаллов содержат по два одинаковых максимума

Т а б л и ц а 1.14

Параметры элементарных ячеек
двухмерных кристаллов Na^+ , K^+ -АТРазы

Кристаллическая форма	<i>a</i> , нм	<i>b</i> , нм	γ , град	S^* , нм
1	5,9	7,0	111	38,5
2	7,2	12,3	77	86,0
3	5,6	16,6	89	92,8

* S — площадь ячейки, *a*, *b*, γ — параметры элементарной ячейки кристалла.

плотности (а) и дополнительную область, недоступную для контрастирующего вещества (b). (Более подробно это будет рассмотрено при обсуждении трехмерной структуры кристаллов). Поскольку значения фаз дифракционных максимумов на Фурье-спектрах кристаллов близки к 0 или 180°, а на профильтрованных изображениях отчетливо прослеживается наличие поворотной оси второго порядка, то обе формы кристаллов по типу симметрии следует отнести к двухсторонней плоской группе p21.

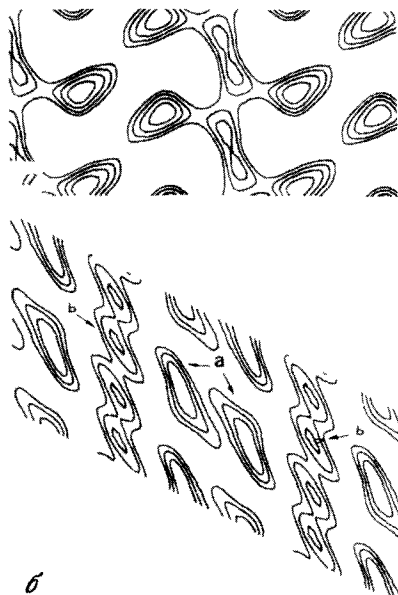
Липидный состав мембран и их физико-химические свойства, по-видимому, могут решающим образом повлиять на результаты кристаллизации. Поэтому описанный выше подход не является универсальным. Так, например, для мембран дисков сетчатки глаза быка, содержащих в качестве основного белка (> 90%) родопсин, применение подобной технологии в широком диапазоне условий (рН, состав среды и т.п.) не привело к образованию кристаллов. Вместе с тем, модификация липидной фазы путем экстракции части липидов обработкой детергентом Твин-80 аналогично тому, как это было сделано в работе [586], позволила с помощью медленного охлаждения получить кристаллы. Микрофотография и профильтрованное изображение одного из таких кристаллов приведены на рис. I.54. Кристаллы характеризуются симметрией p4 и их элементарные ячейки (параметры $a = b = 87 \text{ Å}$, $\gamma = 90^\circ$) образованы четырьмя молекулами родопсина, организованными в димеры. Качество таких кристаллов довольно высокое: разрешение 25 Å. Однако их относительное количество не превышает нескольких процентов от общего содержания мембран [587].

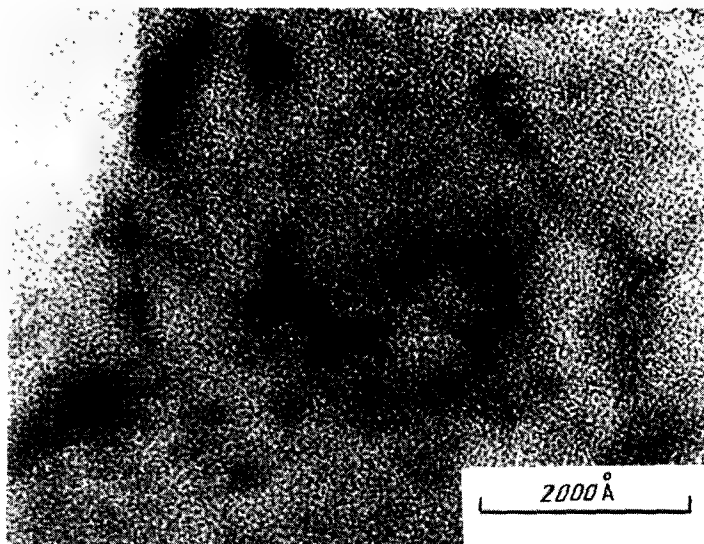
Для мембранных белков наиболее перспективной является, по-видимому, кристаллизация реконструкцией делипидизированного белка

Р и с. 1.53. Профильрованные изображения кристаллов β -субъединицы Na^+ , K^+ -АТФазы, полученных в присутствии ионов Ca^{2+} (а) и Mg^{2+} (б)

в бислои определенного липидного состава [588, 589]. Широких систематических исследований по двумерной кристаллизации мембранных белков до настоящего времени не проведено. Поэтому эмпирический подход все еще является основным. Однако результаты, полученные в ходе изучения нескольких мембранных белков, позволяют выделить ряд факторов, влияющих на формирование кристаллов. В общем случае кристаллизация реконструкции является более многопараметренным процессом, чем в случае кристаллизации без полной сольубилизации мембран. В зависимости от условий реконструкция белков в липид может приводить к образованию различных структур: много- и однослойных протеолипосом, трубчатых структур, плоских мембран. Наиболее удобны для электронно-микроскопического изучения плоские мембраны. Необходимо также, чтобы реконструированный в такие мембраны белок имел "плотную упаковку". Для получения требуемых структур определяющими являются выбор липидов и детергента, концентрация белка и количественное соотношение липид/белок. Так, при использовании "жидких" липидов варьирование этого соотношения может приводить к появлению всего спектра упомянутых выше структур. Для получения кристаллов обычно приходится проводить изучение влияния на характер упаковки белков в мембранах и таких параметров, как pH, ионная сила, наличие многовалентных ионов. В некоторых случаях необходимо также присутствие специфических лигандов, стабилизирующих белок в одном из конформационных состояний. Существенное влияние могут оказывать также температура и скорость процесса реконструкции, т.е. удаления детергента.

Одним из примеров такого подхода может служить исследование процессов реконструкции в липидные бислои F_1F_0 -АТФазы (АТФ-синтазы) митохондрий [590, 591]. Митохондриальная F_1F_0 -АТФаза состоит из двух основных компонентов: мембранной (F_0) и периферической (F_1) частей [592]. Субъединичная топография F_1F_0 -АТФазы к настоящему времени практически не изучена, поэтому разработка методов получения всего комплекса в форме мембранных образований, пригодных для таких исследований, является актуальной. Для демонстрации объема работы, которую зачастую приходится проводить в ходе таких





Р и с. 1.54. Микрофото-
графия и картина оптиче-
ской дифракции от выбран-
ного участка двухмерного
кристалла родопсина

Негативное контрастирование
2%-ным водным раствором ура-
нилацетата

исследований, в табл. I.15 представлены параметры и диапазоны их изменений в экспериментах по реконструкции F_1F_0 -АТРазы. В результате было установлено, что в зависимости от выбранных условий реконструкции образуются четыре типа белково-липидных структур: протеолипосомы – замкнутые липосомы со встроенными белковыми молекулами (рис. I.55); мембранные фрагменты – незамкнутые липидные бислои со встроенными белковыми молекулами (рис. I.56); нитевидные структуры – белковые образования, возможно, включающие в свой состав и липидные молекулы, в которых молекулы F_1F_0 -АТРазы располагаются преимущественно в одном направлении, образуя нити (рис. I.57) и двухмерные кристаллы – плоские липидные бислои с упорядоченно встроенными молекулами F_1F_0 -АТРазы (рис. I.58). Кроме того, в препаратах обычно присутствуют отдельные молекулы F_1F_0 -АТРазы, фрагменты молекул, чисто липидные мембраны и липосомы, а также аморфный осадок. Содержание подобных образований может

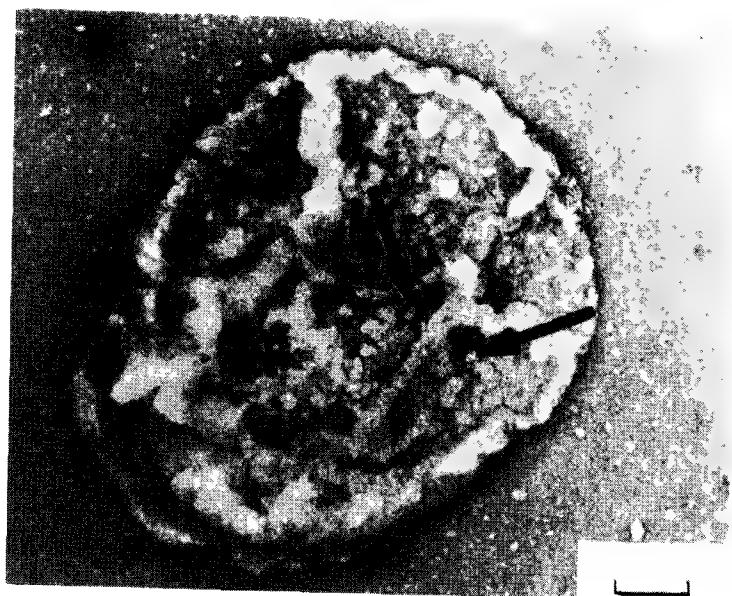
составлять от 20 до 90% от общей массы препарата и зависит от чистоты и качества препаратов белка и липида, используемых при реконструкции. Как правило, исследуемые препараты содержат несколько типов структур, например, протеолипосомы и мембранные фрагменты одновременно. Их относительное содержание зависит от конкретных параметров эксперимента по реконструкции: соотношения липид/белок/детергент, pH, ионной силы среды, наличия многовалентных ионов, природы используемых липидов и детергентов, а также температуры.

В качестве детергента были опробованы: N, N-диметилдодециламино-N-оксид (лаурилдиметиламиноксид, ЛДАО), n-(трет-октил)фениловый эфир полиэтиленгликоля (тритон X-100), 3-[3-холамидопропил)-диметиламмоний]-пропансульфонат (ЧАПС, фирменное название по первым буквам английского названия детергента) и октил-D-глюкопиранозид (октилглюкозид). Оказалось, что использование тритона X-100 нецелесообразно, так как детергент имеет низкую критическую константу мицеллообразования (~ 0,25 мМ) и плохо удаляется диализом. Поскольку при этом время проведения диализа увеличивается до 48 ч, то происходит частичная денатурация белка, что делает невозможным упорядоченное расположение молекул F_1F_0 -АТФазы в липидном бислое. В таких условиях образуются только протеолипосомы и мембранные фрагменты. При сокращении времени проведения диализа детергент удаляется неполностью, что приводит к образованию многослойных мембранных структур с расстоянием между слоями около 5 нм. Сравнение характерных размеров таких структур с размерами F_1 -АТФазы (12·12·7,4 нм) [593] указывает на то, что они не содержат молекул F_1F_0 -АТФазы и их следует отнести к исключительно липиддетергентным образованиям. Аналогичные структуры были выявлены и при проведении реконструкции с ЛДАО, когда детергент удаляется не полностью (через 8–12 ч после начала диализа). По-видимому, отмеченные многослойные структуры являются промежуточными перед образованием как чисто липидных мембранных фрагментов, так и мембранных фрагментов со встроенными молекулами F_1F_0 -АТФазы: при последующем понижении концентрации детергента происходит замыкание малых бислойных участков таких структур в единую мембрану и встраивание молекул F_1F_0 -АТФазы в липидный матрикс. Более перспективным было использование для реконструкции F_1F_0 -АТФазы ЧАПС и октилглюкозида, критические

Т а б л и ц а 1.15

Диапазоны изменения параметров в экспериментах по реконструкции F_1F_0 -АТФазы

Параметр	Диапазон изменения
Концентрация белка	1–3 мг/мл
липид	1–3 мг/мл
детергента	0,15–0,3%
Состав буфера для диализа	
CH ₃ COONa или Трис-HCl	50–150 мМ
NaCl	50–150 мМ
MgCl ₂	5–20 мМ
NaH ₂ PO ₄	0–5 мМ
pH среды	3,0–8,5
Температура	5–25°
Продолжительность	12–48 ч

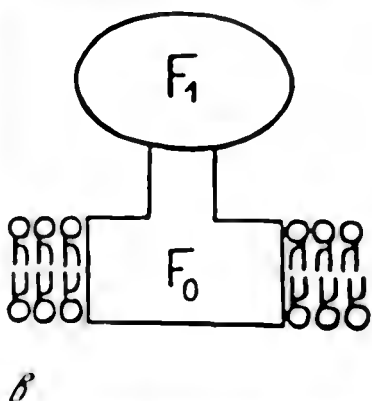
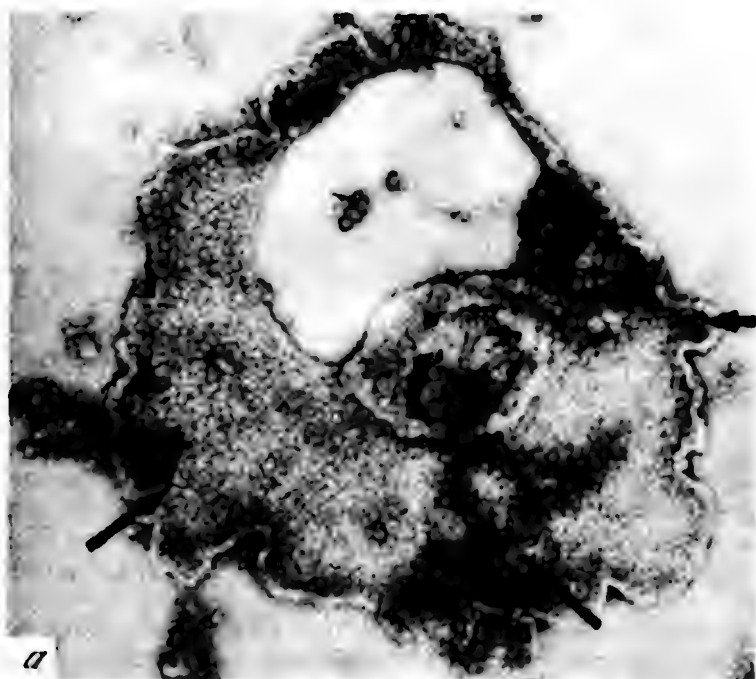


Р и с. 1.55. Микрофотография однослойной протеолипосомы

Реконструкционная система соевый фосфатидилхолин—ЛДАО— F_1F_0 -АТФазы в соотношении 1:1:1 (по массе), рН 6. Контрастирование 0,11%-ным водным раствором уранилацетата. Стрелки указывают на одиночные молекулы F_1F_0 -АТФазы. Калибровка — 0,1 мкм

константы мицеллообразования которых равны соответственно 1,4 и 25 мМ [594, 595]. В данном случае имеет место хорошее встраивание интактного белкового комплекса в липидный бислой, однако двухмерные кристаллы и нитевидные структуры в таких условиях получить не удалось. Вероятно, это связано с индивидуальными особенностями структур соответствующих детергент-липид белковых мицелл.

В качестве липида, кроме фосфатидилхолина из соевых бобов (СФХ), использовали: яичный фосфатидилхолин (ЯФХ) и синтетический димиристоилфосфатидилхолин (ДМФХ). Встраивание F_1F_0 -АТФазы в бислой из ЯФХ имеет место, однако образование двухмерных кристаллов и нитевидных структур обнаружено не было. Возможно, это связано с меньшей подвижностью молекул ЯФХ в образующемся бислое по сравнению с СФХ (температуры фазового перехода гель — жидкий кристалл для ЯФХ и СФХ близки к 0° , но для ЯФХ она немного выше) и согласуется с тем, что использование ДМФХ (температура фазового перехода 23°) приводило к образованию больших мембранных фрагментов с отдельно встроенными молекулами F_1F_0 -АТФазы. Кроме того, в данном случае существенно возростала доля чисто липидных образований: мембранных фрагментов, не содержащих белковых молекул, и липосом. Поскольку эксперименты по реконструкции проводили при комнатной температуре ($\sim 20^\circ$), при которой ДМФХ находился в относительно жестком гелеобразном состоянии, то, по-види-



Р и с. 156. Микрофотографии мембранных фрагментов, полученных в той же конструкционной системе, что и на рис. 155, но при pH 4,5

a — проекция в плоскости мембраны; *б* — латеральная проекция; *в* — общепринятая модель F_1F_0 — АТФазы в липидной мембране. Контрастирование 0,1%-ным водным раствором уранилцетата. Стрелки указывают на отдельные молекулы белка. Калибровка — 0,1 $\mu\text{м}$



Р и с. I.57. Микрофотографии нитевидных структур

Контрастирование 0,1%-ным водным раствором уранилацетата. Стрелки указывают на одиночные молекулы F_1F_0 -АТФазы. Калибровка — 0,1 мкм

мому, это затрудняло встраивание белковых молекул в липидный матрикс.

Таким образом, для успешной реконструкции F_1F_0 -АТФазы в липидный бислой необходимо наличие в диализуемой смеси молекул фосфатидилхолина с различной длиной и степенью насыщения углеводородных цепей (как в случае СФХ или ЯФХ), что обеспечивает более точное соответствие липидного окружения внутримембранной части белкового комплекса. При этом встраивание молекул АТФазы в липидный бислой менее избирательно по отношению к типу используемых для реконструкции детергента и липида, чем упорядоченность белковых молекул этого комплекса в липидном матриксе.

Для получения плоских мембранных фрагментов с плотно упакованными в них молекулами белка наиболее подходящими в качестве детергента оказались системы ЯФХ или ЛДАО. Однако для получения двухмерных кристаллов необходимо оптимизировать и ряд других параметров реконструкционного эксперимента: рН, ионную силу, добавку двухвалентных катионов и др. Данные по влиянию рН на образование мембранных структур F_1F_0 -АТФазы в этой реконструкционной системе приведены в табл. I.16. Образование протеолипосом и мембранных фрагментов происходит практически по всему диапазону рН от 3,3 до 8,5, однако размеры таких структур могут сильно варьировать. В двух диапазонах рН: 3,3–3,7 и 5,0–6,4 происходит образование больших мономеллярных протеолипосом (до 1 мкм в диаметре) (рис. I.55). При рН около 7 протеолипосомы невелики по размерам (0,1–0,3 мкм). Большие мембранные фрагменты (линейные размеры 0,5–1,0 мкм) присутствовали в препаратах с рН 4,3–8,5 (рис. I.56). При значениях рН < 4,3 происходит образование небольших мембранных фрагментов (линейные размеры < 0,3 мкм). Таким образом, варьируя рН, можно подобрать условия для получения протеолипосом и мембран определенного размера.

Образование нитевидных структур в препаратах F_1F_0 -АТФазы происходит в узком диапазоне рН (около 4,8). Нити могут быть замкнуты в кольцо и иметь продольные размеры до 1 мкм, поперечные в пределах

Влияние pH среды на образование мембранных структур F_1F_0 -АТФазы

рН среды	Характерные белково-липидные структуры, образующиеся в результате диализа			
	Протеолипосомы, диаметр, мкм	Мембранные фрагменты	Двухмерные кристаллы	Нити

3,0–3,2	0,2–0,3	*	–	–
3,3–3,7	0,3–0,5	*	–	–
3,8–4,2	*	До 0,3	–	–
4,3–4,6	*	До 1	До 0,4	–
4,7–4,9	*	0,5–1	До 0,4	До 1
5,0–5,5	До 1	0,5–1	–	–
5,6–6,4	0,3–0,6	0,5–1	–	–
6,5–7,2	До 0,3	0,5–1	–	–
7,3–8,5	*	До 0,5	–	–

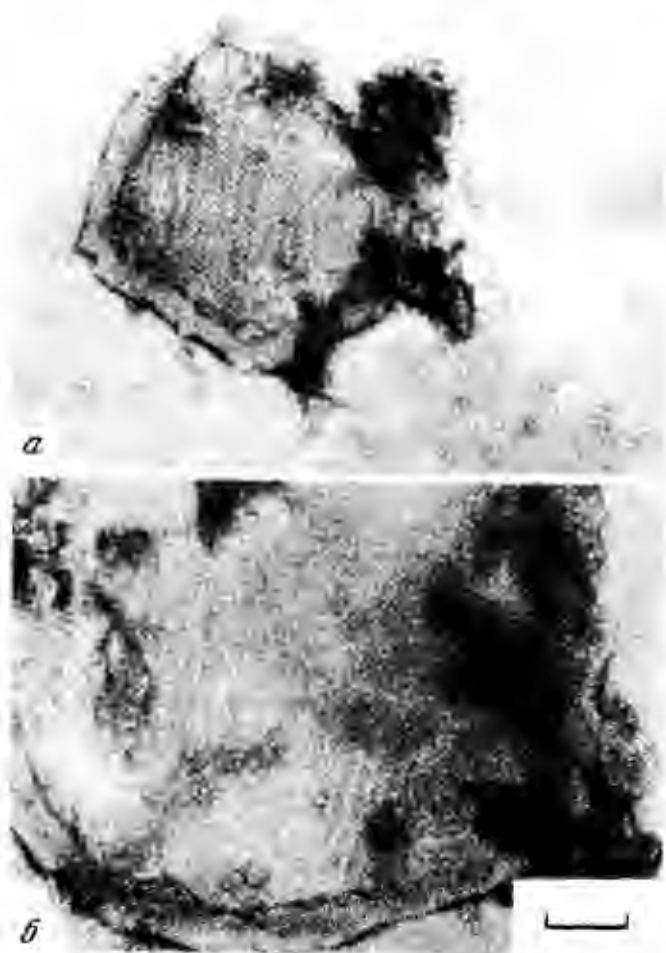
Примечание. Описанные выше структуры были получены при следующих условиях: СФХ/ЛДАО/ F_1F_0 -АТФазы (1:1:1 по массе); концентрация F_1F_0 -АТФазы 3 мг/мл; состав буфера для диализа: 50 мМ CH_3COONa (при pH 3,0–6,4) или 50 мМ Tris-HCl (при pH 6,5–8,5), 5 мМ MgCl_2 , 50 мМ NaCl , 5 мМ NaH_2PO_4 ; продолжительность диализа 24 ч; $t = 20^\circ$.

* Структурные образования содержатся в образцах в незначительных количествах.

0,015–0,02 мкм. Типичные электронные микрофотографии таких структур приведены на рис. 1.57. Эти структуры, по-видимому, представляют собой расположенные в два ряда молекулы F_1F_0 -АТФазы, присоединенные друг к другу своими гидрофобными областями. Основную роль в таких взаимодействиях должен играть мембранный сектор F_0 , а немембранные части комплекса, вероятно, экспонированы на поверхности нити. Возможно, что нитевидные образования в силу их относительной упорядоченности являются промежуточными структурами перед образованием двухмерных кристаллов. Это согласуется с тем, что диапазоны pH образования нитей и двухмерных кристаллов практически совпадают (табл. 1.16).

Для образования двухмерных кристаллов F_1F_0 -АТФазы характерен узкий диапазон pH: 4,5–5,0. Типичные электронные микрофотографии таких кристаллов представлены на рис. 1.58 [596]. Максимальный линейный размер кристаллов составляет ~ 0,4 мкм. Как видно из микрофотографий, электронноплотные области, отвечающие белковым молекулам двухмерного кристалла, в проекции на плоскость мембраны образуют характерные полосы шириной ~ 12 нм. Расстояние между центрами полос составляет ~ 25 нм.

По данным оптической дифракции и Фурье-анализа, разрешение на

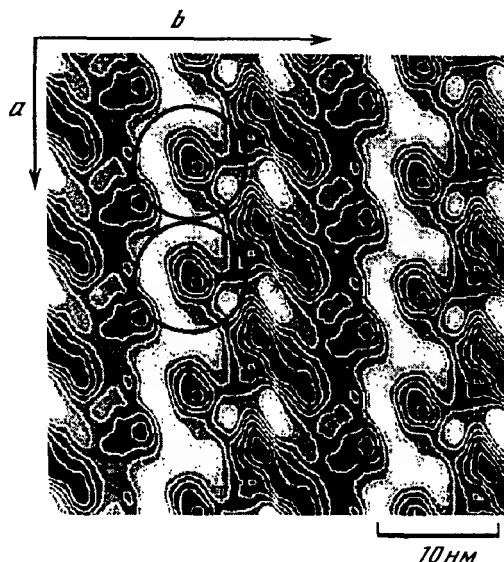


Р и с. 158. Микрофотографии двухмерных кристаллов F_1F_0 -АТФазы
a — монокристалл; *б* — мембранный фрагмент, содержащий несколько кристаллических областей с различной ориентацией решетки. Контрастирование 0,1%-ным водным раствором уранилацетата. Калибровка — 0,1 мкм

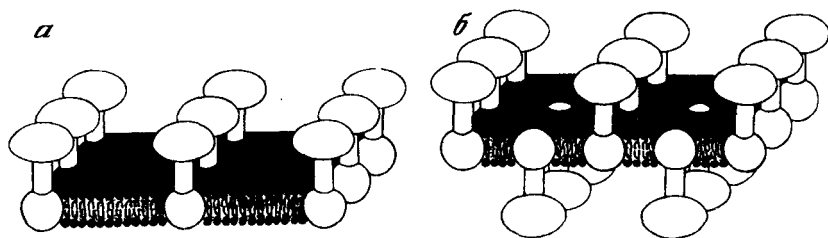
изображениях двухмерных кристаллов составляет $\sim 2,8$ нм. Элементарная ячейка имеет следующие кристаллографические параметры: $a = 13$ нм, $b = 25$ нм, $\gamma = 86^\circ$. Отфильтрованное от статистических шумов изображение негативно контрастированного двухмерного кристалла (проекция на плоскость мембраны) представлено на рис. 159. Незаполненные контрастером области, соответствующие белковым молекулам (негативное контрастирование белка), образуют характерные полосы в направлении вектора a . Известно, что одна из проекций F_1 -АТФазы, называемая фронтальной, имеет гексагональную форму с

Р и с. I.59. Профиль-
рованное изображение двух-
мерного кристалла F_1F_0 -
АТРазы (проекция на
плоскости мембраны)

Окружностями выделены участ-
ки, соответствующие отдельным
молекулам белка; a и b —
базисные векторы элементарной
ячейки



Р и с. I.60. Альтернативные
модели структурной органи-
зации двухмерного кристалла
 F_1F_0 -АТРазы с одной (a) и
двумя (b) молекулами белка
на элементарную ячейку



поперечником ~ 12 нм, а боковые проекции форму прямоугольника или параллелограмма с шириной в пределах 7,4–8 нм. Следовательно, каждая полоса состоит из выстроенных в один ряд молекул F_1F_0 -АТРазы, причем периферические части F_1 , по-видимому, контактируют друг с другом и ориентированы своими фронтальными сторонами параллельно поверхности мембраны.

Таким образом, молекуле АТР-синтетазы в проекции на плоскость мембраны соответствует область в виде круга диаметром ~ 12 нм, содержащая шесть максимумов белковой плотности вокруг полости, заполненной контрастером. Вклад в два из них (имеются в виду максимумы между соседними белковыми молекулами) вносится двумя молекулами АТР-синтетазы (рис. I.59). По всей вероятности, отсутствие гексагональной симметрии является результатом заметных искажений в упаковке молекул F_1 на плоскости мембраны (именно они ограничивают разрешение до $\sim 2,8$ нм). Не исключен и небольшой наклон фронтальной стороны F_1 относительно плоскости мембраны, вносящий свой вклад в нарушение гексагональной симметрии.

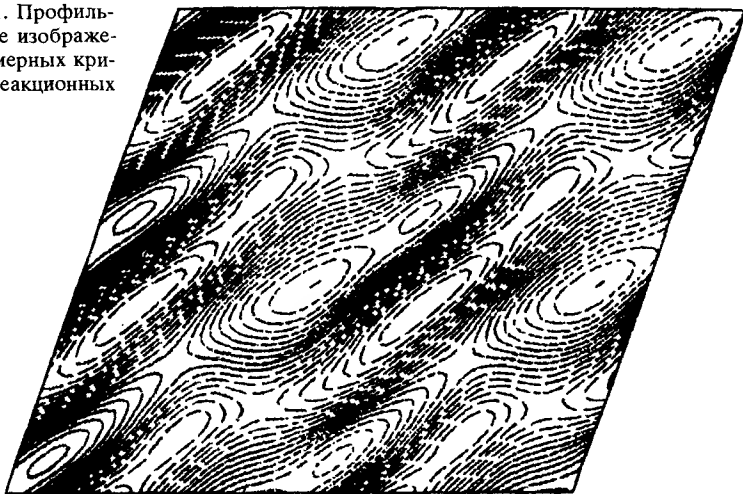
Из сопоставления размеров элементарной ячейки кристалла

(13 · 25,3 нм) с размерами фронтальной проекции F_1 -АТРазы (12 · 12 нм) можно заключить, что на одну элементарную ячейку приходится одна или две молекулы АТР-синтетазы. В первом случае непрокрашенная область двухмерного кристалла между соседними рядами из молекул АТР-синтетазы соответствует липидному окружению, а во втором – внутримембранной части F_0 другой белковой молекулы, имеющей противоположную ориентацию в мембране. В соответствии с этим можно предложить две альтернативные модели структурной организации двухмерного кристалла: с одной или двумя молекулами АТР-синтетазы на одну элементарную ячейку (рис. 1.60). Первая модель предполагает асимметричное встраивание белковых молекул в липидный бислой: все периферические части F_1 расположены по одну сторону мембраны, образующей двухмерный кристалл. Согласно второй модели, встраивание происходит с обеих сторон липидного бислоя: на каждую элементарную ячейку кристалла приходится две противоположно ориентированные в мембране молекулы АТР-синтетазы.

Следует отметить, что в соответствии с первой моделью (рис. 1.59) должны существовать два типа проекционных изображений: вид двухмерного кристалла со стороны периферических частей F_1 , приведенный на рис. 1.58, и совершенно отличный от него вид с противоположной стороны мембраны. Поскольку изображений, соответствующих последнему типу, обнаружить не удалось, предпочтение отдают второй модели. В ее пользу свидетельствует и тот факт, что только эта модель предполагает, что в двухмерном кристалле АТР-синтетазы упорядоченное расположение белковых молекул в липидном бислое обеспечивается их взаимодействием друг с другом как внутри белкового ряда, так и между рядами. Первое осуществляется за счет периферических частей F_1 соседних молекул, а второе за счет внутримембранных частей F_0 . Последнее взаимодействие может иметь место только в случае второй модели, для которой расстояние между соседними белковыми рядами в 2 раза меньше, чем в первой модели, и составляет ~ 12,8 нм, что хорошо соответствует максимальному продольному размеру F_1 (12 нм, см. [597]). Что касается первой модели, то, согласно ей, взаимодействие между соседними белковыми рядами осуществляется за счет липидного окружения. Маловероятно, что такие взаимодействия могут стабилизировать упорядоченное образование типа двухмерного кристалла.

Другим примером кристаллизации реконструкцией служат реакционные центры зеленых бактерий *Chloroflexus aurantiacus*. Этот мембранный белок, играющий ключевую роль в процессах бактериального фотосинтеза, образован двумя типами субъединиц – L и M с молекулярными массами 28 и 32 кДа соответственно [598, 599]. Для получения двухмерных кристаллов в исходную фракцию реакционных центров (РЦ) (10 мг РЦ/мл в 50 mM Трис-HCl-буфера, pH 9,0, содержащего 0,1% ЛДАО) добавляли солюбилизованный фосфатидилхолин в соотношениях от 2:1 до 1:2 (по массе). Реконструкцию реакционных центров в двухмерные кристаллы осуществляли путем диализа от детергента. При этом варьировали следующие параметры:

Р и с. I.61. Профиль-
тированное изображе-
ние двумерных кри-
сталлов реакционных
центров



температуру, при которой проводился анализ, ионную силу, ионный состав, отношение липид/белок, рН, скорость диализа [600]. Наиболее существенными параметрами кристаллизации оказались температура (20°) и рН среды (8,0). Максимальный линейный размер кристаллов достигал 2 мкм. Относительное количество таких кристаллов от общего числа мембранных фрагментов в препаратах составляло $\sim 50\%$. По данным Фурье-анализа и оптической дифракции разрешение на таких кристаллах достигает 2–3 нм. Фурье-синтез изображений кристаллов проводился для двухсторонней плоской группы $p1$. Отфильтрованное изображение негативно-контрастированного кристалла реакционного центра (четыре элементарные ячейки) представлено на рис. I.61.

Элементарная ячейка имеет следующие кристаллографические параметры: $a = 5,7$ нм, $b = 5,9$ нм, $\gamma = 70^{\circ}$. Из рис. I.61 видно, что в элементарной ячейке кристалла можно выделить два различных по размерам локальных максимума белковой плотности с расстоянием между их центрами 3 нм. Неодинаковость этих максимумов по размерам, с одной стороны, может быть обусловлена артефактами электронно-микроскопического контрастирования (например, неравномерностью распределения контрастирующего вещества по кристаллу), с другой стороны, различной степенью экспонированности структурных единиц кристалла из плоскости (a , b) в случае, если каждый локальный максимум соответствует одной и той же структурной единице, имеющей одинаковую ориентацию относительно плоскости кристалла. Локальные максимумы плотности также могут отражать разную ориентацию структурных единиц кристалла относительно плоскости (a , b) или соответствовать различным структурным единицам.

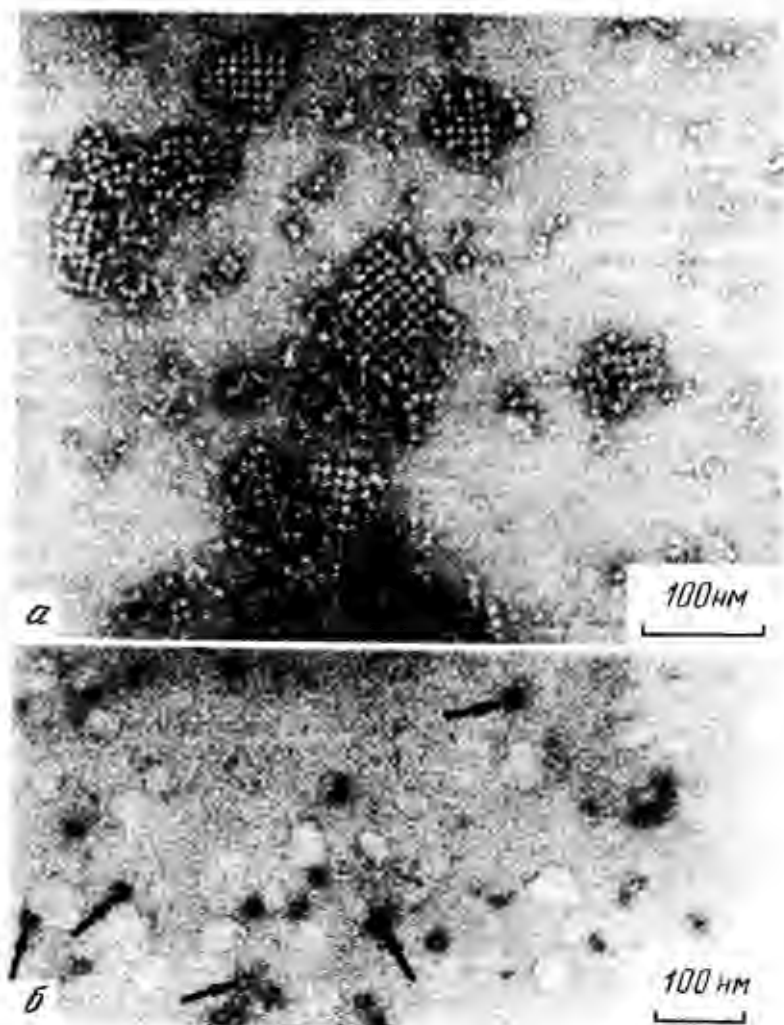
Сравнение аминокислотных последовательностей L- и M-субъединиц Chl. aurantiacus и пурпурных бактерий [598, 599, 601–603] позволяет сделать вывод о высокой степени их гомологии. По данным

рентгеноструктурного анализа, гетеродимер из пурпурных бактерий, образованный L- и M-субъединицами реакционного центра, представляет собой цилиндр с эллиптическим поперечным сечением. Высота цилиндра 5 нм, большой и малый диаметры эллиптического сечения равны соответственно 6 и 4 нм [602]. Из сопоставления размеров эллиптического сечения гетеродимера и элементарной ячейки двухмерного кристалла реакционного центра следует, что на одну элементарную ячейку приходится один гетеродимер, состоящий из L- и M-субъединиц. Поскольку параметр $b = 5,9$ нм практически совпадает с большим диаметром сечения гетеродимера (6 нм), можно сделать вывод, что гетеродимеры в двухмерном кристалле плотно прилегают друг к другу своими гидрофобными поверхностями в направлении b , а в пространстве между ними в других направлениях находятся молекулы липида. Это может быть установлено, вероятно, при построении трехмерной модели кристалла. В дальнейшем представляется перспективным получение двухмерных кристаллов комплексов реакционных центров с другими компонентами фотосинтетической системы (например, с молекулами антенного аппарата) с целью изучения их надмолекулярной организации, как это было сделано, например, при изучении цитохром-редуктазы [604].

Еще один пример – аргининсвязывающий белок (АСБ), выделенный из мембран коры головного мозга. Молекулярная масса полипептидной цепи составляет ~ 68 кДа [605]. Двухмерные кристаллы получали диализом от детергента смеси АСБ и ДМФХ, солюбилизированных β -D-октилгликозидом [606]. Средний продольный размер таких кристаллов составляет $\sim 0,2$ мкм, поперечный 0,05 мкм. Кристаллы представляют собой ленты двухмерных слоев, свернутые в трубы. Вероятно, при кристаллизации первоначально молекулы АСБ собираются в нитевидные структуры, которые далее ассоциируют друг с другом, образуя ленты двухмерных слоев. Такие ленты в свою очередь образуют трубообразные структуры, в дальнейшем уже не склонные к более высокой степени ассоциации. Элементарная ячейка имеет следующие кристаллографические параметры: $a = 8,3$ нм, $b = 8,9$ нм, $\gamma = 99^\circ$.

Как отмечалось, разрешение на таких кристаллах составляло около 3 нм, т.е. меньше предельного разрешения метода негативного контрастирования, которое ограничено приблизительно 2 нм. Применение на первых этапах цифровой обработки изображений методов кросс-корреляционного анализа позволяет несколько повысить разрешение. Однако существенное увеличение разрешения можно ожидать при повышении степени упорядоченности кристаллов за счет дальнейшей оптимизации методов кристаллизации. Кроме того, двухслойность полученных кристаллов затрудняет как интерпретацию их проекционной структуры, так и дальнейшую работу по определению их трехмерной структуры.

Одной из общих особенностей двухмерных кристаллов различных мембранных белков является их полиморфизм, т.е. одновременное существование нескольких кристаллических форм. Изменение условий



Р и с. 1.62. Микрофотографии препаратов α -латротоксина в форме двухмерных кристаллов (а) и одиночных молекул (б)

Контрастирование 1%-ным водным раствором уранилацетата

кристаллизации обычно меняет лишь их относительное содержание. Такой полиморфизм может отражать динамику процесса кристаллизации, а также являться следствием существования нескольких конформационно-стабильных состояний молекул белка. Параллельное структурное исследование различных кристаллических форм обычно является полезным при установлении и интерпретации их пространственной структуры.

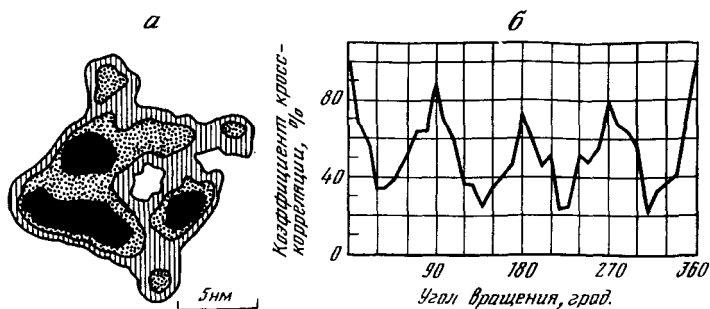
Кристаллизация водорастворимых белков. В заключение раздела,

посвященного кристаллизации, следует сказать, что двухмерные кристаллы могут быть получены не только для интегральных мембранных белков, но и для некоторых водорастворимых, которые могут существовать в растворах в отсутствие детергентов. К ним относится α -латротоксин, являющийся основным токсическим компонентом яда паука каракурта. Этот белок состоит из идентичных негликозилированных полипептидных цепей, в состав каждой из которых входит 1041 аминокислотный остаток [607]. При негативном контрастировании гомогенного препарата α -латротоксин выявляется в виде частиц, имеющих размеры в пределах 10–15 нм (рис. I.62,а).

При сохранении ряда общих черт частицы могут довольно значительно отличаться друг от друга, что свидетельствует о большой вариабельности ориентаций частиц токсина на пленке-подложке. Это затрудняет применение методов обработки одиночных изображений молекул в данном случае, так как для получения набора статистически достоверных проекций молекулы, соответствующих различным ориентациям частиц на пленке-подложке, потребовалось бы обработать большое количество изображений. С другой стороны, цифровая обработка электронно-микроскопических изображений упорядоченных образований белка могла бы существенно сократить время, необходимое для получения трехмерной структуры. Как правило, частицы α -латротоксина равномерно распределены по подложке и адсорбируются на нее в произвольных ориентациях. Однако при высокой концентрации ионов Mg^{2+} (0,5 М) и в узком диапазоне pH (8,2–8,5) α -латротоксин агрегировал в двухмерные кристаллы, что наблюдалось при негативном контрастировании таких препаратов (рис. I.62,б) [608].

Кристаллы имели размеры до 0,4 мкм, изображения некоторых из них давали отчетливую оптическую дифракцию, что позволило провести Фурье-фильтрацию изображений на ЭВМ с применением кристаллографических программ. На рис. I.63,а представлена карта распределения контрастирующего вещества в элементарной ячейке кристалла после Фурье-фильтрации с разрешением 4 нм. Параметры ячейки $a = b = 15,55$ нм, $\gamma = 90^\circ$, соотношение между амплитудами и фазами рефлексов, а также высокие коэффициенты кросс-корреляции изображения самого с собой при его вращении на 90° , 180° и 270° (рис. I.63,б) позволяют заключить, что кристаллы принадлежат к двухсторонней плоской группе симметрии $p4$. С учетом симметрии было рассчитано распределение контрастирующего вещества в кристалле, контурная карта которого приведена на рис. I.64.

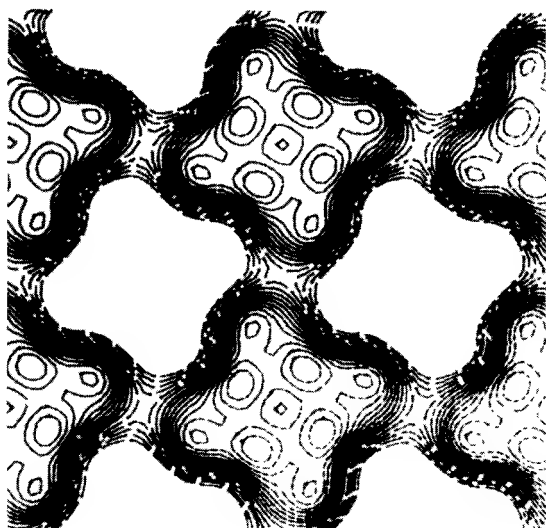
Полученная проекция белковой части элементарной ячейки α -латротоксина имеет вид квадрата со стороной около 11 нм, который имеет в центре минимум 2,5 нм в диаметре и восемь (четыре больших и четыре малых) максимумов белковой плотности. Наличие оси симметрии четвертого порядка указывает на то, что элементарная ячейка кристалла состоит из четырех одинаковых частей (4-, 8-, 12-...полипептидных цепей). Молекулярная масса протомера, по данным электрофореза и пептидного анализа, составляет 130 кДа. Расчет этого



Р и с. 1.63. Изображение одной элементарной ячейки двухмерного кристалла α-латротоксина после Фурье-фильтрации (а) и кривая автокорреляции этого изображения при вращении вокруг оси, проходящей через его центр (б)

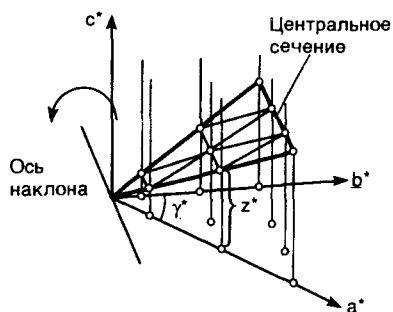
Р и с. 1.64. Изображение элементарных ячеек двухмерного кристалла α-латротоксина после Фурье-фильтрации с учетом поворотной симметрии четвертого порядка

В каждой ячейке недоступная для контрастера область представляет собой квадрат со стороной 110 Å и содержит четыре основных пика белковой плотности



параметра на основе структуры полноразмерного гена дает величину 157 кДа. Предполагая, что элементарная ячейка образована четырьмя протомерами с молекулярной массой $130 \cdot 4 = 520$ или $157 \cdot 4 = 628$ кДа, а также считая, что ее удельный парциальный объем близок к величине $1,3 \text{ Å}^3/\text{Да}$, получаем нижнюю оценку для толщины двухмерного кристалла – 5,6 и 6,7 нм соответственно. Для восьми полипептидных цепей (1040 или 1256 кДа) этот параметр будет составлять 11,2 и 13,4 нм. Большее количество протомеров не будет укладываться в данный объем, так как рассчитанные величины являются оценками снизу, а размеры белковых частиц не превосходят 15 нм.

Таким образом, полученная информация о симметрии кристаллов α-латротоксина указывает на то, что в состав его частиц, выявляемых



Р и с. 1.65. Схематическое изображение трансформанты Фурье двухмерного кристалла, представляющей собой решетку линий, перпендикулярных к плоскости кристалла

при негативном контрастировании, входят 4 или 8 протомеров. Это не позволяет сделать однозначное заключение о составе функционально активной молекулы токсина. Однако то обстоятельство, что минимальной структурной единицей, проявляющейся как для одиночных частиц, так и для двухмерных кристаллов, является тетрамер или октамер, говорит о том, что в растворе белок существует в виде олигомеров идентичных полипептидов. Более детальная информация об относительном расположении полипептидов и их пространственной структуре может быть получена после реконструкции трехмерной структуры молекулы по наклонным изображениям данных кристаллов.

Определение трехмерной структуры белков по данным электронного микроскопирования двухмерных кристаллов. Получение объекта исследования в форме двухмерных кристаллов создает хорошую предпосылку для определения его пространственной структуры. При этом разрешение, с которым в конечном итоге может быть рассчитана пространственная структура, определяется многими факторами. Главным является качество кристаллов; степень их упорядоченности, размеры, стабильность и др.

В отличие от плоской дифракции отдельного изображения полная дифракционная картина от трехмерного объекта представляет собой пространственную решетку. Для расчета трехмерной структуры с помощью Фурье-синтеза необходимо найти амплитуды и фазы рефлексов с индексами l , не равными нулю. Это можно сделать, анализируя изображения, снятые в микроскопе при наклоне кристалла относительно оптической оси прибора. Напомним, что согласно теореме проектирования Фурье-трансформанта любого изображения является одним из центральных сечений трехмерной трансформанты [580]. На рис. 1.65 векторы a^* и b^* задают плоскость такого сечения в обратном пространстве, на которой находятся максимумы с индексами $(h, k, 0)$. Через максимумы можно провести линии обратной решетки, нормальные к этой поверхности, на которых и должны располагаться максимумы с индексами $l \neq 0$. Трансформанта наклонного изображения, являющаяся также центральным сечением, задает другую плоскость, пересекающую линии обратной решетки, и значения амплитуд и фаз

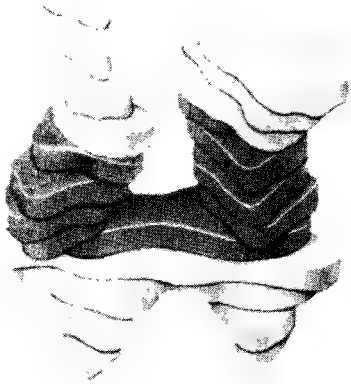
дифрагированных лучей в точках пересечения. Аналогичные операции со всей совокупностью наклонных изображений, снятых в максимально широком диапазоне углов наклона, позволяют провести много таких новых плоскостей и, следовательно, построить полную трехмерную трансформанту, т.е. определить амплитуды и фазы для всех узлов обратной пространственной решетки. Далее, используя полученную информацию, с помощью Фурье-синтеза, аналогично процедуре в рентгеноструктурном анализе, рассчитывают пространственную структуру как распределение рассеивающего электроны вещества в объеме элементарной ячейки кристалла.

Суммируя вышеизложенное, можно сказать, что исследование пространственной структуры двухмерных кристаллов состоит из нескольких этапов: 1) получение микрофотографий кристаллов в максимально доступном диапазоне углов их наклона относительно оптической оси микроскопа; 2) получение Фурье-трансформант изображений и их фильтрация от шумов; 3) комбинирование всех изображений для построения трехмерной трансформанты и определения структурных факторов; 4) Фурье-синтез пространственной структуры.

К настоящему времени для нескольких мембранных белков выполнены такие реконструкции трехмерной структуры. Показательным примером может служить Na^+ , K^+ -АТРаза почек свиньи. Как было показано в предыдущем разделе, Na^+ , K^+ -АТРаза может быть закристаллизована в нескольких различных формах. Для изучения трехмерной структуры наиболее подходящей является кристаллическая форма 2, поскольку в присутствии ионов Mg^{2+} , VO_3^- и K^+ она является доминирующей и эти кристаллы обладают более высокой симметрией, чем, например, форма 1. Трехмерная реконструкция выполнена в пространственной группе P2 на основе данных пяти независимых наклонных серий [609]. Полученная таким образом пространственная структура, представленная в виде параллельных плоскости мембраны сечений высотой 7,5 Å, приведена на рис. 1.66. Элементарная ячейка образована двумя идентичными белковыми массами. Рассчитанный объем структуры составляет 340000 Å³. Если принять парциальный объем белка равным 1,3 Å³/Да [610], то молекулярная масса составит 260 кДа, что хорошо согласуется с молекулярной массой двух α , β -протомеров (280 кДа) [611, 612]. Поскольку кристаллизация белка достигалась без полной сольubilизации мембран, протомеры имеют одинаковую ориентацию относительно плоскости мембраны.

Высота протомеров составляет 100 Å, что значительно превышает обычную толщину липидных мембран. Поэтому следует ожидать, что значительная часть массы каждого протомера экспонирована на мембранных поверхностях. Анализ гидрофобности аминокислотных последовательностей α - и β -субъединиц [611, 612], а также данные по гидрофильному и гидрофобному мечению белка в составе открытых мембранных фрагментов и "inside-out" протеолипосомах [609], показывает, что внутримембранный домен протомера образован не более чем 25%-ми массы каждой субъединицы и его суммарная молекулярная масса не

Р и с. 1.66. Трехмерная модель элементарной ячейки кристалла Na^+, K^+ -АТФазы. Предполагаемый мембранный фрагмент окрашен в темный цвет

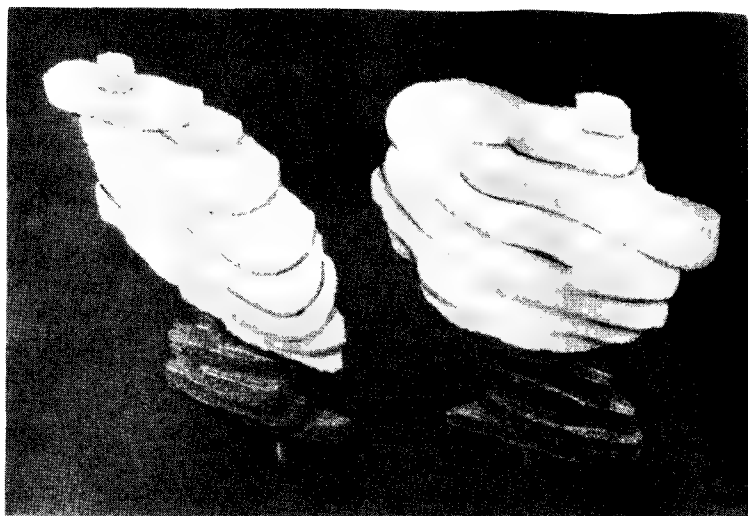


превышает 40 кДа. Таким образом, 75% массы α - и β -субъединиц распределены между вне- и внутриклеточными доменами протомера. По данным химического мечення флюорескаминоом соотношение масс этих доменов для α -субъединицы составляет 3:1. Полипептидная цепь β -субъединицы экспонирована только на внеклеточной поверхности мембраны [582]. В со-

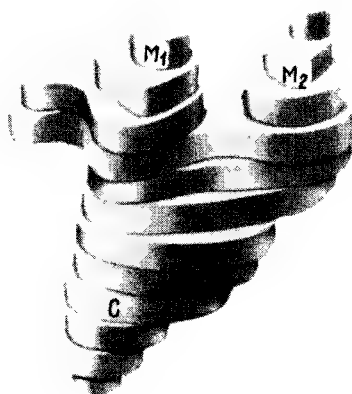
ответствии с этим молекулярные массы гидрофильных доменов протомера на обеих мембранных поверхностях составляют около 50 кДа. В связи с тем, что общий объем протомера ($170000 \text{ \AA}^3$) соответствует 150 кДа, то на модели (рис. 1.66) эти домены образованы четырьмя верхними и четырьмя нижними сечениями. Пять сечений, расположенных в средней части, являются гидрофобным сегментом, и его высота ($40 \text{ \AA}$) хорошо согласуется с обычной толщиной липидного бислоя.

Трехмерная структура с разрешением $20 \text{ \AA}$ не позволяет установить взаимное расположение α - и β -субъединиц в протомере. В таком случае для изучения субъединичной топографии может быть применен подход, состоящий в раздельном изучении пространственной структуры субъединиц и их сопоставлении со структурой молекулы фермента. С этой целью была выделена β -субъединица Na^+, K^+ -АТФазы и получены двухмерные кристаллы белка. Аналогично случаю полного фермента используемый препарат представляет собой мембранные фрагменты, содержащие β -субъединицу в качестве единственного белка. Медленное охлаждение суспензии таких мембран до 4° в присутствии ионов Mg^{2+} или Ca^{2+} приводит к формированию двухмерных кристаллов (рис. 1.53).

Поскольку кристаллизация полного фермента проводилась в присутствии ионов Mg^{2+} , то для изучения структуры β -субъединицы были выбраны кристаллы, формирующиеся в присутствии этого иона. Напомним, что параметры элементарной ячейки составляют: $a = 77 \text{ \AA}$, $b = 177 \text{ \AA}$ и $\gamma = 63^\circ$ и они относятся к плоской группе симметрии $p21$. Элементарная ячейка кристалла образована двумя основными областями, недоступными для контрастирующего вещества, и еще одной дополнительной областью, проходящей в виде непрерывной полосы через всю ячейку (рис. 1.53, *a, б* соответственно). Расчеты трехмерной структуры проводили для пространственной группы $P2_1$, используя электронные микрофотографии кристаллов в диапазоне углов наклона $\pm 60^\circ$. Трехмерная модель структуры двух основных недоступных для контрастирующего вещества областей (а на рис. 1.53) представлена на



Р и с. 1.67. Трехмерная модель элементарной ячейки. Mg^{2+} -формы кристалла β -субъединицы Na^+, K^+ -АТРазы



Р и с. 1.68. Трехмерная модель элементарной ячейки кристалла цитохром-с-оксидазы

рис. 1.67 в виде сечений толщиной $6,5 \text{ \AA}$ параллельных плоскости мембраны [585]. Если принять парциальный объем белка равным $1,3 \text{ \AA}^3/\text{Да}$ [610], то масса каждой такой области составит 40 кДа, что хорошо согласуется с молекулярной массой одной β -субъединицы 35 кДа [612]. Дополнительный район (b на рис. 1.53) в трехмерной модели не представлен, так как он является, по-видимому, фрагментом липидного бислоя. Об этом свидетельствует его высота ($40 \text{ \AA}$) и локализация вдоль c -оси трехмерной ячейки кристалла: в той ее части, где находятся гидрофобные домены β -субъединиц (см. ниже).

Таким образом, в состав элементарной ячейки кристалла входят две β -субъединицы. Особенностью их пространственной структуры

является выраженная асимметрия распределения массы вдоль направления, перпендикулярного плоскости мембраны. Иммунохимическим анализом участки полипептидной цепи β -субъединицы удалось обнаружить только на внеклеточной мембранной поверхности [582]. По данным химической модификации Na^+ , K^+ -АТФазы в составе нативных мембран и "right-side-out" протеолипосом, организация β -субъединицы в мембранах характеризуется значительной асимметрией: гидрофильные участки полипептидной цепи образуют один гидрофильный домен, экспонированный на внеклеточной мембранной поверхности [613]. На внутриклеточной поверхности по этим данным может находиться не более 10% молекулярной массы. Анализ профиля гидрофобности аминокислотной последовательности β -субъединицы позволяет предположить наличие не более, чем четырех ее трансмембранных участков [612], что соответствует массе внутримембранного домена 10 кДа. Это хорошо согласуется с данными по химической модификации непроницаемыми реагентами и гидрофобному мечению [613, 614]. Таким образом, массы гидрофильного и гидрофобного доменов составляют соответственно 25 и 10 кДа. (Следует иметь в виду, однако, что такие расчеты массы для гидрофобного домена должны рассматриваться лишь как оценка "сверху", а для гидрофильного – как оценка "снизу"). В соответствии с такими оценками на модели (рис. I.67) гидрофильный домен представлен восемью сечениями относительно широкой части модели, а остальные сечения образуют ее гидрофобный домен. Именно в этой части трехмерной элементарной ячейки кристалла расположен дополнительный район, недоступный для контрастирующего вещества (рис. I.53,б) и являющийся, по-видимому, фрагментом липидного бислоя. Характерной особенностью структуры элементарной ячейки кристалла β -субъединицы является отсутствие выраженных контактов между соседними молекулами. В случае Na^+ , K^+ -АТФазы α, β -протомеры имеют область контакта, расположенную асимметрично относительно мембраны (рис. I.66). Это свидетельствует о том, что образование димеров Na^+ , K^+ -АТФазы обусловлено взаимодействием α -субъединиц и область контакта находится на внутриклеточной мембранной поверхности, так как именно там экспонирована основная часть их молекулярной массы. Кроме того, сравнение трехмерных структур β -субъединицы и α, β -протомера (рис. I.66 и I.67) выявляет подобие гидрофильного домена β -субъединицы и верхней части α, β -протомера.

Аналогичное исследование было проведено для мультимолекулярной системы цитохром-с-оксидазы – терминального компонента дыхательной цепи всех аэробных организмов [615]. Субъединичный состав этого комплекса варьирует в зависимости от источника выделения. В митохондриях сердца быка он образован 12 субъединицами. Их молекулярные массы составляют: I – 57, II – 26, III – 30, IV – 17, V – 12,5 кДа, а для остальных эта величина лежит в диапазоне 5–10 кДа. Реконструкция трехмерной структуры (рис. I.68) показывает, что по форме молекула напоминает букву Y, ее высота составляет 11 нм и она состоит из трех доменов. Два верхних (M_1 и M_2), по крайней мере, частично эк-

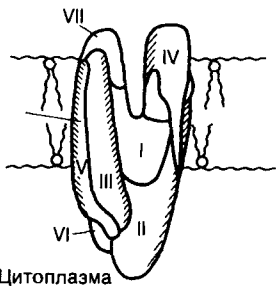
спонированы на внешней поверхности мембраны и расстояние между центрами их масс составляет 4 нм. Значительная часть массы третьего домена (С) экспонирована в цитозоль. Комбинирование этих результатов с многочисленными данными по химической модификации гидрофобными и гидрофильными соединениями, кросс-сшивающими реагентами и иммунохимического мечения позволило предложить топографическую модель структуры цитохром-с-оксидазы в мембране, представленную на рис. 1.69.

При электронно-микроскопическом исследовании разрешение может быть ограничено многими причинами, главными из которых являются степень упорядоченности кристаллов и способ их подготовки к микроскопированию. Обычно такие кристаллы легко разрушаются электронным пучком и их приходится заключать в тонкие пленки контрастирующего вещества. Подобная процедура увеличивает радиационную стабильность кристаллов, повышает контрастность изображений, но значительно ухудшает разрешение. Предельное разрешение в этих случаях определяется зернистостью контрастирующего вещества (или размером его кристаллов) и не превышает 15–20 Å. В ряду объектов, исследованных методами трехмерной электронной микроскопии, следует выделить бактериородопсин. В галофильных бактериях этот белок, функционирующий как светозависимый "протонный насос", организован в так называемые пурпурные мембраны – участки клеточной мембраны, содержащие бактериородопсин в кристаллической упаковке. Другими словами, бактериородопсин функционирует в клетке в форме двухмерных кристаллов, которые могут быть выделены в высокочистом состоянии.

Уникальной особенностью таких природных кристаллов оказалась их очень высокая упорядоченность и радиационная стабильность. Последнее обстоятельство позволило провести их исследование без применения негативного контрастирования [610]. Методом электронной дифракции⁷ на таких кристаллах были определены амплитуды структурных факторов вплоть до разрешения 6–7 Å в плоскости мембраны. Изображения неконтрастированных пурпурных мембран характеризуются низким контрастом (< 1%). Цифровая обработка их позволила рассчитать и значения фаз для этого набора структурных факторов. И хотя трехмерный набор данных, созданный в результате анализа "наклонных серий" изображений, имел разрешение в направлении нормальном к плоскости мембраны 14 Å, реконструкция трехмерной структуры позволила описать не только внешнюю форму, но и внутреннее строение молекулы. Оказалось, что полипептидная цепь бактериородопсина, состоящая из 248 аминокислотных остатков, образует семь α -спиральных *транс*-мембранных сегментов⁸ (рис. 1.70). При этом общая высота

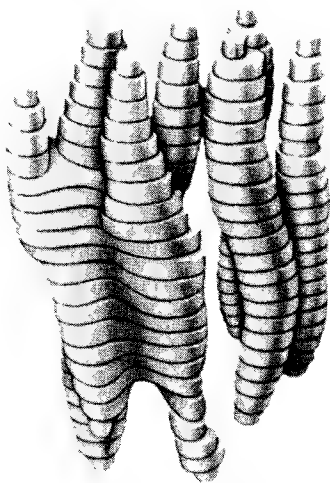
⁷ Электронная дифракция – один из режимов работы электронного микроскопа, при котором отключают ток в объективной линзе, формирующей изображение объекта.

⁸ Достигнутое разрешение не позволяет визуализировать вторичную структуру полипептидной цепи. Конформация α -спирали была показана с помощью рентгеновской дифракции.

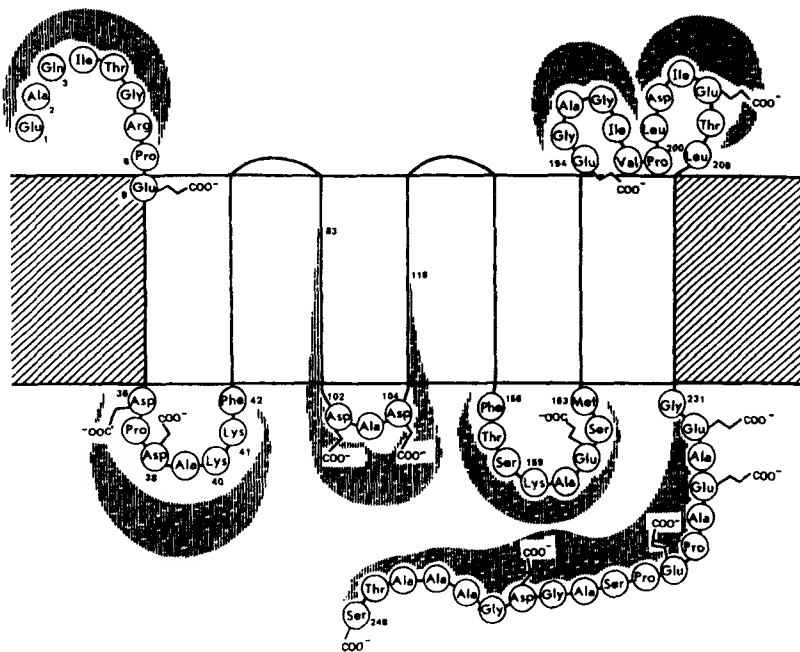


Цитоплазма

Р и с. I.69. Модель молекулы цитохром-с-оксидазы с указанием возможного расположения образующих ее субъединиц



Р и с. I.70. Трехмерная модель элементарной ячейки кристалла бактериородопсина



Р и с. I.71. Модель укладки полипептидной цепи бактериородопсина в мембране
Заштрихованные области указывают на выявленные антигенные детерминанты

молекулы соответствует толщине липидной мембраны ($\sim 40 \text{ \AA}$), что указывает на то, что основная часть молекулы белка погружена в мембрану и лишь небольшие участки полипептидной цепи экспонированы на ее поверхностях. Такой вывод впоследствии удалось подтвердить с помощью методов ограниченного протеолиза и иммунохимического мечения с использованием моноклональных антител к синтетическим фрагментам полипептидной цепи (рис. I.71).

Главным фактором, лимитирующим разрешение в описанном выше исследовании, являлось радиационное разрушение кристаллов в ходе съемки. В последние годы заметное развитие получили методы электронного микроскопирования при низких и сверхнизких температурах, которые позволяют многократно повышать радиационную устойчивость биологических объектов. Их использование для исследования кристаллов бактериородопсина дало возможность собрать экспериментальные данные до разрешения $3 \text{ \AA}$ в плоскости, параллельной мембране [616]. И хотя в направлении, нормальном к этой плоскости, разрешение оказалось значительно хуже, реконструкция трехмерной структуры позволила выявить ряд тонких деталей структуры, таких, как локализация боковых цепей некоторых аминокислот и β -иононового кольца ретиналя. Используя полученные данные как реперные точки и сведения о первичной структуре, удалось вписать полипептидную цепь в трехмерную карту белковой плотности и рассчитать атомную модель структуры белка.

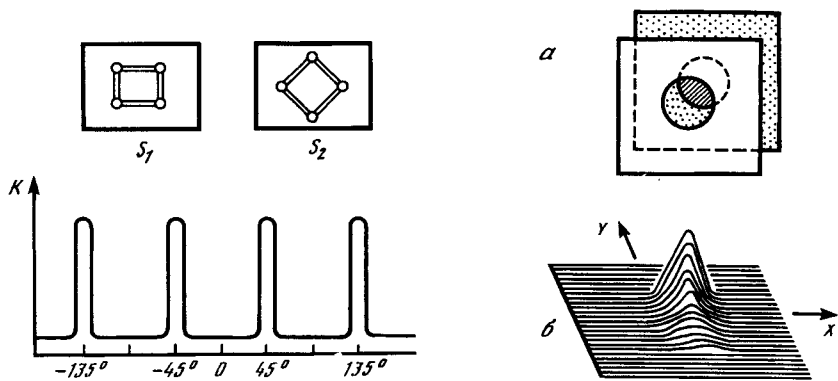
6.3. ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ НЕПЕРИОДИЧЕСКИХ СТРУКТУР

К настоящему времени заметное развитие получила группа методов цифрового процессинга изображений неперидических объектов, позволяющих исследовать пространственную структуру отдельных макромолекул или их комплексов. Как и в случае двухмерных кристаллов, пространственная структура неперидических объектов рассчитывается на основе параметров набора их наклонных проекций. Однако в данном случае для получения статистически достоверной модели пространственной структуры необходимо усреднить большое число исходных проекций или индивидуальных трехмерных синтезов. В принципе можно использовать два подхода. Первый из них состоит в съемке наклонных изображений отдельных выбранных частиц и последующем синтезе их трехмерных структур, усредняемых затем между собой. Второй подход основан на анализе изображений всех частиц на пленке-подложке. Благодаря неупорядоченной ориентации частиц при адсорбции на пленку-подложку их изображения представляют различные проекции одной структуры, т.е. являются "наклонными" относительно друг друга. Проведя сортировку изображений, усредняют одинаковые проекции и сформировывают из них "наклонную серию", описывающую пространственную структуру объекта. Если число проанализированных

проекций велико, трехмерный синтез дает уже статистически усредненную структуру белка.

Первым и чрезвычайно важным этапом работы является исследование проекционной структуры молекул. Именно особенности проекционной структуры позволяют выбрать дальнейшую стратегию изучения пространственной структуры объекта. Задача исследования проекционной структуры состоит в выборе типичных для данного объекта проекций, установлении их характерных размеров, формы и т.п. и, наконец, в получении проекционных карт, характеризующихся определенным разрешением. Для решения этой задачи необходимо прежде всего получить высококачественные изображения объекта. В настоящее время электронная микроскопия одиночных молекул и их ансамблей практически полностью основывается на методе негативного контрастирования. Разрешение изображений негативно-контрастированных препаратов не превышает 15–20 Å. Поэтому целесообразно на одном из первых этапов цифровой обработки изображений провести их фильтрацию от шумов, обусловленных контрастированием. Отсутствие периодичности в изображении делает невозможным Фурье-фильтрацию, применяемую в случае двухмерных кристаллов. При фильтрации непериодического изображения его Фурье-трансформанту умножают на так называемую фильтрующую функцию. Чаще всего используется двумерная функция распределения Гаусса. Такая математическая операция позволяет плавно удалить из трансформанты коэффициенты Фурье, генерированные деталями изображения, размер которых меньше предельного разрешения. Поэтому профильтрованное изображение, полученное преобразованием Фурье его трансформанты, обычно характеризуется более высоким соотношением полезный сигнал/шум, что облегчает последующие стадии цифровой обработки.

Следующий этап работы состоит в классификации изображений, т.е. выявлении одинаковых (или очень сходных) изображений и объединении их в группы для усреднения. Классификация предполагает сравнение изображений для определения их соответствия друг другу. Объективной мерой соответствия двух изображений может служить их кросс-корреляционная функция. Поэтому корреляционный анализ является традиционным методом исследования изображений. Простейшим наглядным примером могут служить два одинаковых произвольных изображения, повернутых на разные углы относительно их центров. Совместив центры изображений и поворачивая одно из них относительно другого, рассчитывают зависимость коэффициента их кросс-корреляции от угла поворота. Изображения на рис. I.72 таковы, что при повороте на каждые 90° они будут полностью совмещаться и коэффициенты кросс-корреляции будут иметь максимальное значение, т.е. равняться единице. На реальных микрофотографиях изображения никогда не бывают полностью одинаковыми, и эти коэффициенты всегда меньше единицы. Проводя корреляционный анализ, изображения можно не только вращать, но и сдвигать относительно друг друга (рис. I.73). Величины коэффициентов корреляции в максимумах функции служат качественной мерой схожести изображения, а углы пово-



Р и с. 1.72. Зависимость коэффициента кросс-корреляций K изображений S_1 и S_2 от угла поворота одного из них относительно другого

Р и с. 1.73. Экспериментальный пример кросс-корреляционного анализа двух идентичных изображений (круглые отверстия)

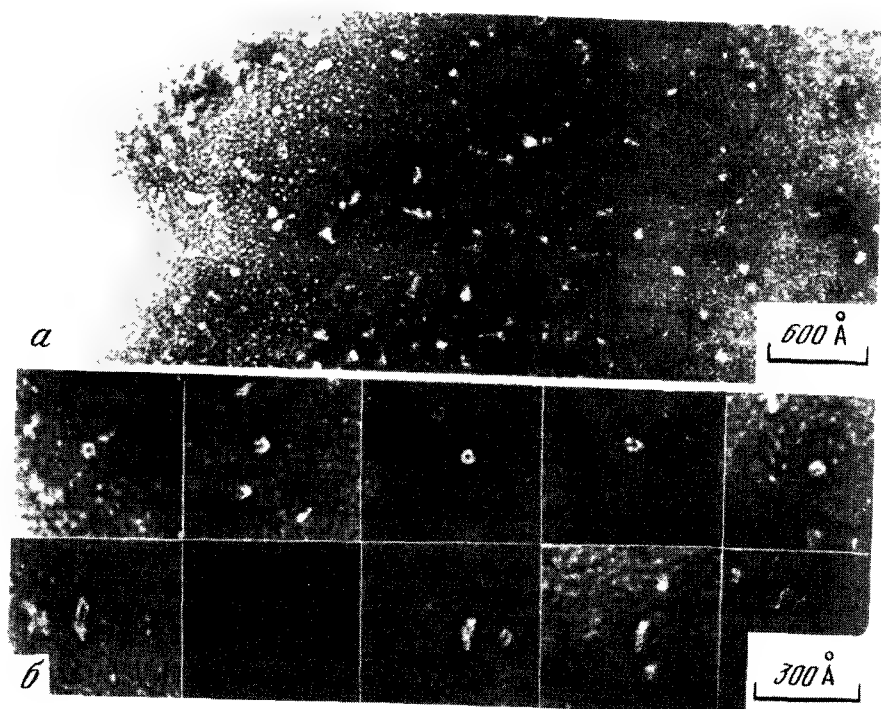
a — две одинаковые непрозрачные "маски" с круглыми отверстиями помещают в пучок света и сдвигают в различные положения относительно друг друга; мерой позиционной корреляции является интенсивность света, проходящего через заштрихованную область; *б* — трехмерная диаграмма зависимости интенсивности проходящего света от величины сдвига верхней "маски"; максимум наблюдается при полном совмещении краев обоих отверстий

рота или сдвиги определяют взаимную ориентацию, в которой соответствие изображений максимально.

Традиционная стратегия корреляционного анализа электронно-микроскопических изображений основана на выборе из экспериментального набора профильтрованных изображений одного в качестве модельной проекции. По этой модели проводится ориентация остальных изображений и усреднение тех из них, максимальные коэффициенты корреляции которых с моделью достаточно высоки. Усредненную проекцию можно принять за новую модель и весь цикл анализа повторить заново. Описанная стратегия анализа эффективна в тех случаях, когда в силу особенностей структуры объекта количество возможных его ориентаций на пленке-подложке мало и соответствующие им изображения хорошо различимы визуально на микрофотографиях. Далее, используя ограниченное число визуально выбранных моделей, легко классифицируют все изображения и получают проекционную структуру объекта, усреднив изображения внутри классов.

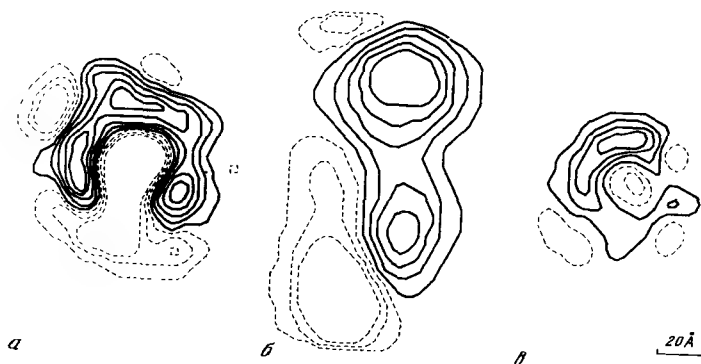
Примером успешного применения такой стратегии служат результаты исследования быстрых натриевых каналов, полученных в очищенном виде после солюбилизации мембран электровозбудимых тканей [617]. Функционирование этих белков обеспечивает потенциалзависимое изменение ионной проницаемости мембран и, тем самым, прохождения электрических импульсов вдоль нервных волокон.

Визуальный анализ микрофотографии солюбилизированных препаратов (рис. 1.74) позволяет обнаружить два класса изображений



Р и с. 1.74. Микрофотографии солюбилизованного препарата Na-каналов

Негативное контрастирование 2%-ным водным раствором уранилацетата. *а* — общий вид и *б* — частицы типа "квадрат" (вверху) и палочкообразные структуры (внизу) при большем увеличении, выбранные для анализа с помощью цифрового процессинга



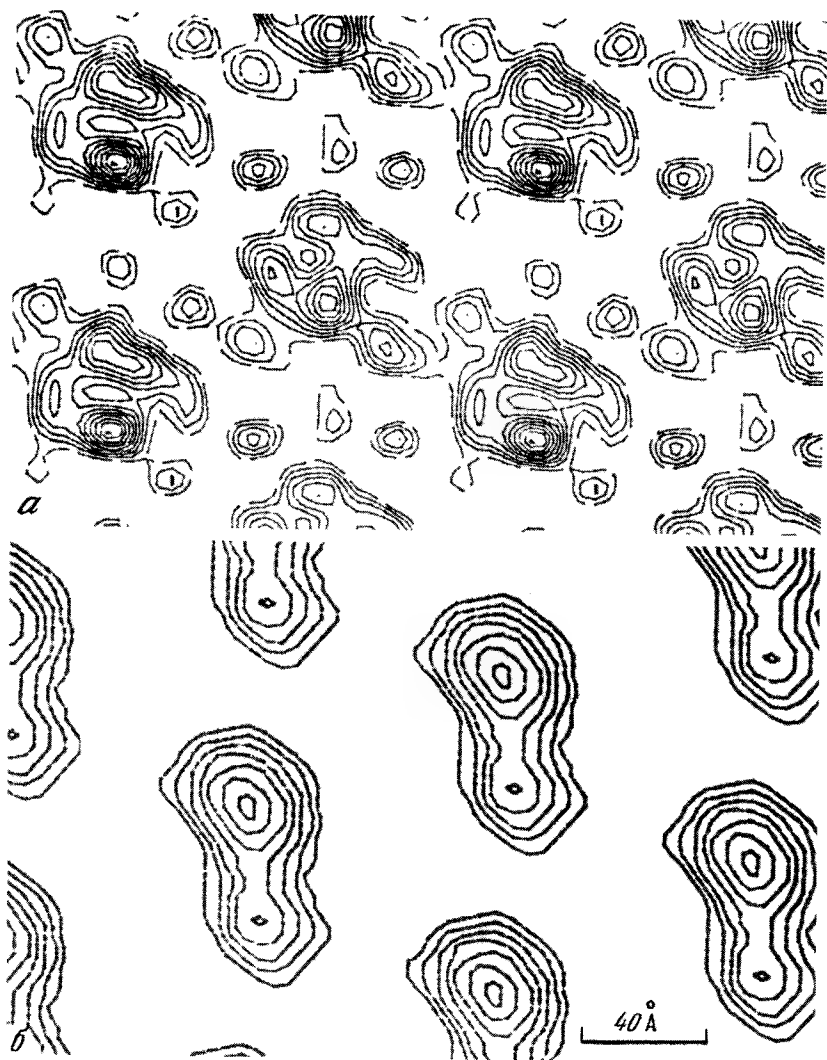
Р и с. 1.75. Усредненные проекции структуры Na-канала

а, в — проекции, выявленные в препаратах белка, реконструированных в липидные мембраны;
б — проекция, выявляемая только в препаратах солюбилизованного белка

частиц: напоминающие по форме квадрат (рис. I.74, *а*) и удлинённые палочкообразные (рис. I.74, *б*). Тонкая структура этих частиц, выявляемая с помощью цифрового процессинга их изображений, представлена на рис. I.75, *а, б*. Частицы типа "квадрат" представляют собой розеткообразные структуры. Аналогичные структуры наблюдаются также при исследовании препаратов быстрых натриевых каналов, реконструированных в липидные бислои. Однако в этом случае удастся выявить и второй тип розеток меньшего размера (рис. I.75, *б*). Поскольку два типа розеток характерны для мембранной формы белка, предполагают, что они являются проекциями его структуры и на внутриклеточную поверхность мембран. Палочкообразные частицы, обнаруживаемые только в солиubilизированных препаратах канала, представляют собой, по-видимому, его боковую проекцию.

Статистическую достоверность основных параметров полученных проекций удалось подтвердить с помощью кристаллографического подхода. Попытки получить двумерные кристаллы натриевого канала не увенчались успехом. Однако были получены тонкие трехмерные кристаллы, проекционная структура которых была установлена методами электронно-микроскопической кристаллографии. Как видно из рис. I.76, *а*, проекция на плоскость (h, k, o) содержит два типа структур, основные параметры которых совпадают с мембранными проекциями, выявленными корреляционным анализом (рис. I.76, *б*), хотя и наблюдаются некоторые различия в количестве и высоте максимумов белковой плотности. Вместе с тем боковая проекция, выявленная корреляционным анализом, эквивалентна кристаллической проекции на плоскость (o, k, l) [618]. Наличие трех главных проекций: двух мембранных и боковой, дает возможность представить натриевый канал в мембране в виде суженного в центральной части цилиндра, верхний и нижний диаметры которого неодинаковы (рис. I.77). Высота канала (85 Å), равная максимальному параметру боковой проекции, заметно превышает толщину липидного бислоя. Белок натриевого канала, являющийся функционально трансмембранным, пронизывает мембрану, и, по-видимому, значительная часть полипептидных цепей, образующих его, экспонирована на обеих мембранных поверхностях.

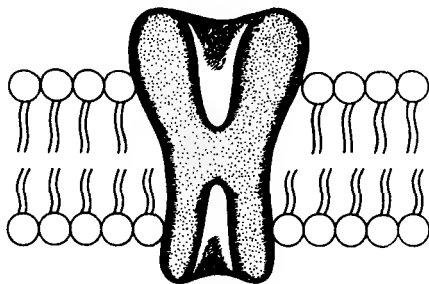
Обращает на себя внимание выраженное сходство проекционных структур белка натриевого канала и ацетилхолинового рецептора [619]. Геометрические параметры проекций несколько меньше в случае белка натриевого канала. Однако в обоих случаях мембранные проекции имеют розеткообразную форму, число пиков белковой плотности у них также одинаково. В центре розеток имеется область с пониженной плотностью. В ацетилхолиновом рецепторе эта область отождествляется с устьем ионного канала. Поскольку проекционные структуры обоих мембранных каналообразующих белков сходны, предложенные на их основе модели пространственной организации также имеют много общих черт (рис. I.78) [620]. В случае ацетилхолинового рецептора правомерность построения моделей пространственной структуры на основе электронно-микроскопических проекций была



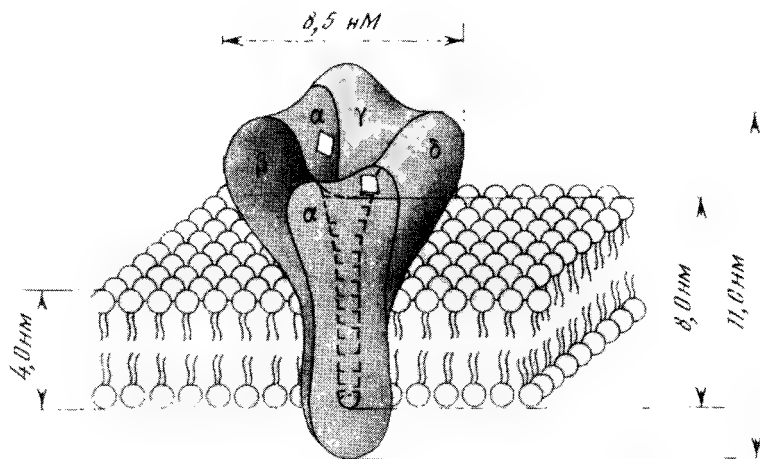
Р и с . 1.76. Структура кристалла белка Na-канала в проекциях на плоскости
a — (h, k, o) ; *б* — (o, k, l)

подтверждена результатами изучения структуры этого белка в форме двухмерных кристаллов [621]. Не исключено, что сходство пространственной организации этих белков обусловлено близостью их первичных структур. Первичная структура белков натриевого канала из мозга крыс в настоящее время не установлена. Однако известна аминокислотная последовательность белка, ответственного за формирование натриевого канала в электроплаксах угря. Результаты сравнительного анализа этого белка и холинорецептора из *Electrophorus*

Р и с. 1.77. Модель пространственной структуры Na-канала, построенная на основе проекций, приведенных на рис. 1.75



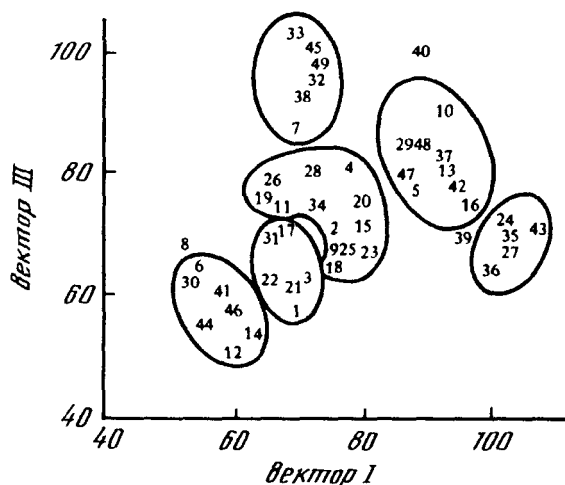
Р и с. 1.78. Модель пространственной структуры ацетилхолинового рецептора



electricus демонстрируют высокий уровень гомологии их первичной структуры. Полученные данные, а также близость пространственных структур двух транспортных систем позволяют сделать предположение о существовании общих принципов структурной организации ионных каналов в мембранах.

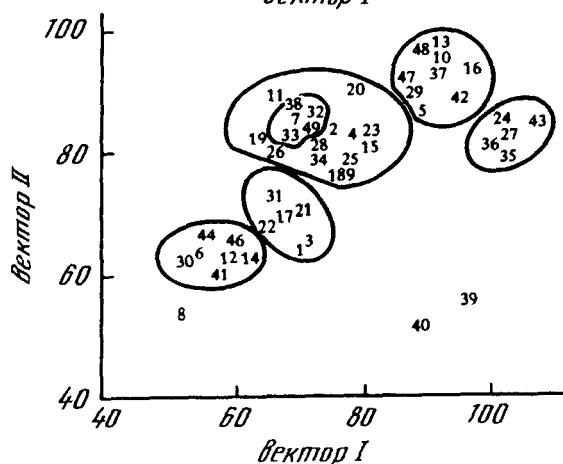
Для многих белков число ориентаций их молекул на пленке—подложке велико. Поэтому на начальном этапе обработки приходится проводить кластерный анализ их изображений. Методы кластеризации изображений также основываются на корреляционном анализе, однако не предполагают выбора каких-то из них в качестве моделей. Напротив, здесь каждое изображение на определенном этапе является "моделью" и сравнивается со всеми остальными — задача чрезвычайно трудоемкая, требующая для решения попарного сравнения всех изображений.

Более экономный способ кластеризации состоит в сравнении всех изображений лишь с несколькими из них, выбранными в качестве



Р и с. 1.79. Классификационная карта 48 изображений солубилизированной кальмодулин-чувствительной аденилатциклазы относительно трех базисных векторов (изображений)

Анализируемые изображения представлены на карте своими порядковыми номерами, указывающими расположение соответствующих им векторов в трехмерном пространстве; изображения, группирующиеся в отдельные классы, обведены сплошными замкнутыми линиями



модельных. Количество таких моделей, достаточное для классификации, зависит от структурных особенностей объекта и определяется экспериментально. Суть метода состоит в том, что существует возможность представления каждого изображения в виде вектора в некотором многомерном пространстве. При этом поиск одинаковых изображений сводится к отбору векторов, углы между которыми малы. Результаты такого исследования можно представить как распределение точек на семействе плоскостей, рассекающих многомерное пространство (рис. 1.79). Координаты задаются векторами, эквивалентными модельным изображениям, а точки определяют положение концов векторов анализируемых изображений. При таком представлении изображения, принадлежащие к одному классу (точнее, концы их векторов), должны располагаться в одной замкнутой области



Р и с. 1.80. Проекционная структура кальмодулин-чувствительной аденилатциклазы

a—в, е — проекции, полученные усреднением изображений, принадлежащих одному классу на классификационных картах (рис. 1.79); *г, д* — проекции, выявленные традиционными методами кросс-корреляционного анализа

многомерного пространства или, что то же самое, располагаться вместе при переходе от одной плоскости к другой.

С использованием этого метода была исследована проекционная структура кальмодулин-чувствительной аденилатциклазы мозга [618, 622]. Этот фермент является ключевым компонентом системы гормональной регуляции, ответственным за трансмембранную передачу химических сигналов. Молекулярная масса образующей его полипептидной цепи составляет 160 кДа. Ферментативная активность может возрасти в сотни раз в присутствии кальмодулина. Исследование проекционной структуры кальмодулин-активируемой аденилатциклазы было проведено как для солиubilизированных препаратов белка, так и после его реконструкции в липидные мембраны. При негативном контрастировании таких мембран кальмодулин-активируемая аденилатциклаза выявляется в виде частиц на поверхности мембран со средним диаметром 70 ± 7 Å. При исследовании солиubilизированных препаратов белка, где число возможных ориентаций молекул велико, проводили предварительную классификацию изображений методом, описанным выше. На рис. 1.79 представлены результаты подобной классификации 48 изображений кальмодулин-чувствительной аденилатциклазы мозга быка. Использование трех моделей для классификации позволило выделить шесть классов изображений. Увеличение числа моделей в этом случае не привело к появлению новых классов изображений. Усредненные проекционные карты приведены на рис. 1.80. Две из них соответствуют мембранным проекциям, выявленным при изучении протеолипосом (рис. 1.80, *a, б*). Одна из проекций (рис. 1.80, *е*) имеет вытянутую форму с максимальным размером 97 Å.

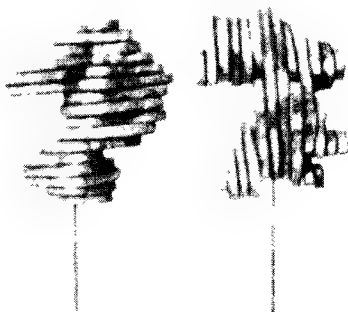
В то же время оценка высоты молекулы, сделанная на основе ее молекулярной массы и основных размеров мембранных проекций, дает величину около 100 Å, что позволяет предположить, что именно она является одной из боковых проекций аденилатциклазы. Размеры остальных частиц, представленных на рис. 1.80, *в-г*, лежат в диапазоне 70—80 Å и, по-видимому, являются наклонными проекциями молекулы.

Высота молекулы, определяемая по ее боковой проекции, значительно превосходит обычную толщину липидного бислоя и свидетельствует о том, что ее мембранный фрагмент относительно невелик. Это хорошо согласуется с данными по измерению парциальных объемов связывающихся с белком детергентов, которые показывают, что гидрофобная область молекулы мала по сравнению с ее гидрофильными частями [623]. Прямых экспериментальных данных, однозначно указывающих на локализацию гидрофобного сегмента молекулы, в настоящее время нет. Однако сходство проекционных структур аденилатциклазы, белка натриевого канала и холинорецептора позволяет заключить, что внутримембранный фрагмент молекулы аденилатциклазы локализован в средней ее части и значительные по размеру участки полипептидной цепи экспонированы на обеих мембранных поверхностях.

Изучение проекционной структуры молекулы является лишь первой частью структурного исследования. Его результаты важны не только для последующей работы, но имеют самостоятельное значение. Достоверное выявление основных проекций зачастую позволяет исследователю уже на этом этапе составить представление о главных особенностях структурной организации молекулы. Очевидно, однако, что наиболее информативной будет реконструкция пространственной структуры. Существует несколько методов такой реконструкции. Выбор конкретного метода зависит от специфики объекта, геометрии электронно-микроскопической съемки, количества проекций и т.п. Рассмотрим общий принцип наиболее простой реконструкции на основе моноаксиальных проекционных данных, т.е. проекций, получаемых при наклоне объекта относительно одной оси. В этом случае трехмерную реконструкцию можно свести к серии двумерных реконструкций. Трехмерный массив — тело реконструкции разбивается на ряд сечений вдоль оси наклона, которые реконструируются одно за другим на основе соответствующих наклонных проекций. Такой метод широко распространен в электронной микроскопии биологических объектов, так как он хорошо обобщается для любых ориентаций объектов, относительно быстро и не требует больших ресурсов памяти ЭВМ.

На рис. 1.81 представлены две полученные этим методом модели структуры кальмодулин-чувствительной аденилатциклазы мозга быка [624]. В основу реконструкции положены единичные наклонные серии изображений двух молекул фермента. "Нулевые" проекции молекул близки к приведенным на рис. 1.80, *а, в* и сильно отличаются друг от друга, поскольку молекулы имеют различную ориентацию относительно пленки-подложки. Тем не менее, как видно на рис. 1.81, обе модели имеют одинаковые размеры и схожи по форме.

Р и с. 1.81. Модели трехмерной структуры аденилатциклазы, синтезированные по наклонным изображениям двух частиц



Такие единичные реконструкции позволяют выявить лишь самые общие особенности структурной организации. Для получения статистически достоверной модели структуры необходимо сделать ряд подобных реконструкций и провести их усреднение. Одна трехмерная реконструкция дает статистически достоверную модель, если она производится на основе усредненных проекций. Однако в данном случае необходимо с помощью развивающихся в настоящее время методов классификации изображений отобрать гомологичные проекции для усреднения. Достаточно сложной является также задача определения относительных "углов наклона" различных проекций. Это обуславливает более высокую трудоемкость исследования одиночных молекул по сравнению с двухмерными кристаллами. В то же время современные темпы развития методов исследования неперiodических образований позволяют надеяться, что в недалеком будущем эффективности обоих подходов сравняются.

* * *

Во многих случаях электронная микроскопия является единственным "прямым" методом изучения пространственной структуры. Это особенно очевидно при исследовании молекулярных комплексов, таких, как рибосомы или мультиферментные мембранные комплексы типа цитохром-с-оксидазы или H^+ -АТФазы мембран митохондрий. Как уже отмечалось выше, наиболее информативно изучение объектов, имеющих упорядоченную структуру. Иногда упорядоченность надмолекулярной структуры присуща объекту исследования *in vivo*, например некоторым вирусам или клеточным органеллам. В редких случаях белки функционируют в биологических мембранах в виде двухмерных кристаллов (бактериородопсин). Обычно белок сначала необходимо выделить из клетки, очистить до гомогенного состояния и, используя специальные методы, сформировать из него упорядоченную структуру:

двухмерный кристалл. К настоящему времени ряд белков получен в форме таких кристаллов, но лишь для некоторых из них электронно-микроскопическое исследование позволило провести реконструкцию пространственной структуры. Примечательно, что почти все они относятся к интегральным мембранным белкам. Для непериодических объектов современные методы процессинга электронно-микроскопических изображений позволяют получить достоверную информацию об их проекционной структуре.

Используя приведенные выше данные, можно провести сравнение пространственных структур ряда функционально неродственных белков, таких, как, например, Na^+ , K^+ -АТРаза почек, белок быстрых натриевых каналов и аденилатциклаза мозга. Их объединяет то, что все они относятся к интегральным мембранным белкам и выполняемые ими функции имеют трансмембранный характер: перенос веществ или передача химических сигналов. По-видимому, благодаря этому их пространственная организация имеет ряд общих особенностей. Все они содержат в своем составе гидрофобный сегмент, локализованный в средней части молекулы. Значительные части полипептидной цепи экспонированы на обеих мембранных поверхностях. Причем в некоторых случаях, таких, как, например, аденилатциклаза, одна полипептидная цепь образует три последовательно расположенных домена: надмембранный, мембранный и внутриклеточный. В других, — например, Na^+ , K^+ -АТРаза, внутриклеточный домен образован α -субъединицей, тогда как β -субъединица экспонирована практически целиком на внешней мембранной поверхности. Аналогичные особенности строения прослеживаются также и для других белков, функции которых имеют трансмембранный характер (ацетилхолиновый рецептор, цитохром-с-оксидаза или цитохром-редуктаза).

Подобный принцип структурной организации диктуется, по-видимому, трансмембранным характером осуществляемых этими белками функций. Основная роль внутримембранного сегмента состоит в удерживании белка в соответствующей ориентации в липидном матриксе мембран. Внемембранные домены содержат в своем составе центры связывания субстратов, эффикторов, переносимых ионов и т.п. и, тем самым, обеспечивают возможность тонкой химической регуляции их функциональной активности.

Нельзя не отметить, что аналогичные заключения об основных чертах пространственной структуры мембранных белков могут быть сделаны, по-видимому, на основе результатов их изучения только химическими методами. Однако представляется неразумным ограничиваться построением умозрительных моделей, имея возможность увидеть как объект исследования выглядит в действительности.

Несмотря на относительно низкое разрешение (15—20 Å), модели пространственной структуры дают уникальную возможность не только определять форму и геометрические параметры молекул или их комплексов, но и исследовать их топографию: количество и относительное расположение доменов или субъединиц, локализацию определенных

маркеров и т.п. Эффективность электронно-микроскопических методов может быть проиллюстрирована на примере ацетилхолинового рецептора. Первоначально этот мембранный белок был подробно исследован методами электронного микроскопирования и цифрового процессинга неперiodических изображений. На основе полученных проекций, данных о химическом строении и свойствах белка была предложена гипотетическая модель его пространственной структуры. Однако только исследование двухмерных кристаллов позволило показать, что молекуле присуща поворотная симметрия пятого порядка относительно оси, перпендикулярной плоскости мембраны. Это означает, что молекула рецептора образована пятью идентичными по форме полипептидными цепями, пересекающими мембрану.

Разрешение 20 Å не является предельным для электронно-микроскопических методов. Рекордное по разрешению исследование было выполнено для бактериородопсина. Высокая упорядоченность кристаллов и уникальная радиационная стабильность позволили получить модель пространственной структуры белка с разрешением 7 Å. Это дало возможность не только выявить внешнюю форму молекулы, но и описать ее внутреннюю структуру, а использование низкотемпературных микроскопов — собрать набор экспериментальных данных до разрешения 3 Å в плоскости мембраны и, в конечном итоге, рассчитать атомную модель структуры белка.

Можно надеяться, что дальнейшее развитие таких исследований и широкое распространение низкотемпературных микроскопов сделают электронную микроскопию столь же информативной, как и рентгеноструктурный анализ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мейер К.Г., Марк Г. Строение высокополимерных органических естественных соединений. Л.: Госхимиздат, 1932.
2. Meyer K.H. // *Biochem. Ztschr.* 1929. Bd. 214. S. 253—261.
3. Meyer K.H. // *Ibid.* 1930. Bd. 217. S. 433—442.
4. Проблема белка: Т. 1. Химическое строение белка / Ред. В.Т. Иванов, Е.М. Попов. М.: Наука, 1995.
5. Herzog R.O., Jancke W. // *Ber. Dt. chem. Ges.* 1920. Bd. 53. S. 2162—2169.
6. Herzog R.O., Jancke W. // *Ibid.* 1921. Bd. 9. S. 320—331.
7. Herzog R.O., Jancke W. // *Naturwissenschaften.* 1926. Bd. 14. S. 1223—1230.
8. Brill R. // *Liebigs Ann.* 1923. Bd. 434. S. 204—210.
9. Meyer K.H., Mark H. // *Ber. Dt. chem. Ges.* 1928. Bd. 61. S. 1932—1938.
10. Bernal J. // *Bioorg. Mem. Fellows Roy. Soc.* 1963. Vol. 9. P. 29—31.
11. Astbury W.T., Street A. // *Philos. Trans. Roy. Soc. London A.* 1933. Vol. 29. P. 193—210.
12. Astbury W.T. // *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 1934. Vol. 2. P. 15—19.
13. Astbury W.T., Street A. // *Philos. Trans. Roy. Soc. London A.* 1931. Vol. 230. P. 75—85.
14. Astbury W.T., Woods H.J. // *Ibid.* 1933. Vol. 232. P. 333—350.
15. Astbury W.T. // *Kolloid Ztschr.* 1934. Bd. 69. S. 340—350.
16. Astbury W.T., Dickinson S. // *Nature.* 1935. Vol. 135. P. 75—78.
17. Astbury W.T., Dickinson S. // *Ibid.* P. 765—769.
18. Astbury W.T. // *Trans. Faraday Soc.* 1940. Vol. 36. P. 871—883.
19. Astbury W.T. // *Chem. and Industry* 1941. Vol. 60. P. 41—53.
20. Astbury W.T., Bell O. // *Nature.* 1940. Vol. 145. P. 421—425.
21. Astbury W.T., Bell O. // *Ibid.* 1941. Vol. 147. P. 696—699.

22. Astbury W.T. // J. Intern. Soc. Leather Trades' Chem. 1940. Vol. 24. P. 69—83.
23. Astbury W.T. // Trans. Faraday Soc. 1938. Vol. 34. P. 378—390.
24. Astbury W.T., Dickinson S., Baily K. // Biochem. J. 1935. Vol. 29. P. 2351—2360.
25. Astbury W.T., Lomax R. // Nature. 1934. Vol. 133. P. 795—798.
26. Astbury W.T., Lomax R. // J. Chem. Soc. 1935. N 3. P. 846.
27. Astbury W.T. // Nature. 1945. Vol. 155. P. 501—505.
28. Woodward R.B., Schramm C.H. // J. Amer. Chem. Soc. 1947. Vol. 69. P. 1551—1559.
29. Astbury W.T., Dalglish C.E., Darmon S.E. et al. // Nature. 1948. Vol. 162. P. 596—600.
30. Astbury W.T. // Adv. Mol. Biol. Harvey Soc. Ser. 1951. Vol. 46. P. 3—49.
31. Huggins M.L. // Annu. Rev. Biochem. 1942. Vol. 11. P. 27—50.
32. Huggins M.L. // Chem. Rev. 1943. Vol. 32. P. 195—225.
33. Corey R.B. // J. Amer. Chem. Soc. 1938. Vol. 60. P. 1598—1608.
34. Corey R.B. // Chem. Rev. 1940. Vol. 26. P. 227—250.
35. Albrecht G., Corey R.B. // J. Amer. Chem. Soc. 1939. Vol. 61. P. 1087—1094.
36. Corey R.B. Advances in protein chemistry. N.Y.: Acad. press, 1948.
37. Levy H.A., Corey R.B. // J. Amer. Chem. Soc. 1941. Vol. 63. P. 2095—2102.
38. Corey R.B., Donohue J. // Ibid. 1950. Vol. 72. P. 2899—2904.
39. Bath J.D., Ellis J.W. // J. Phys. Chem. 1941. Vol. 45. P. 204—212.
40. Buswell A.M., Krebs K.F., Rodebush W.H. // Ibid. 1940. Vol. 44. P. 1126—1133.
41. Taylor H.S. // Proc. Amer. Philos. Soc. 1941. Vol. 85. P. 1—15.
42. Bernal J.D., Crowfoot D. // Nature. 1934. Vol. 133. P. 794—795.
43. Astbury W.T., Bell F.O. // Tabulae Biol. 1939. Vol. 17. P. 90—112.
44. Growfoot C. // Nature. 1939. Vol. 144. P. 1011—1012.
45. Growfoot C. // Chem. Rev. 1941. Vol. 28. P. 215—228.
46. Bernal J.D., Fankuchen I., Perutz M.F. // Nature. 1938. Vol. 141. P. 523—524.
47. Crowfoot D., Riley R.P. // Ibid. P. 521—522.
48. Wrinch D.M. // Philos. Mag. 1937. Vol. 24. P. 940—953.
49. Wrinch D.M. // Ibid. 1941. Vol. 31. P. 177—198.
50. Bamford C.H., Hanby W.E., Happey F. // Proc. Roy. Soc. London A. 1951. Vol. 205. P. 30—47.
51. Ambrose E.J., Hanby W.E. // Nature. 1949. Vol. 163. P. 483—484.
52. Ambrose E.J., Elliott A., Temple R.B. // Ibid. P. 859—862.
53. Zahn H. // Ztschr. Naturforsch. A. 1947. Bd. 26. S. 104—110.
54. Shimanouchi T., Mizushima S. // Bull. Chem. Soc. Jap. 1948. Vol. 21. P. 1—12.
55. Мидзусима С. Строение молекул и внутреннее вращение. М.: Изд-во иностр. лит. 1957.
56. Bragg L., Kendrew J.C., Perutz M.F. // Proc. Roy. Soc. London A. 1950. Vol. 203. P. 321—357.
57. Pauling L., Corey R.B. // J. Amer. Chem. Soc. 1950. Vol. 72. P. 5349.
58. Pauling L., Corey R.B., Branson H.R. // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1951. Vol. 37. P. 205—211.
59. Pauling L., Corey R.B. // Ibid. P. 235—240.
60. Pauling L., Corey R.B. // Ibid. P. 241—250.
61. Pauling L., Corey R.B. // Ibid. P. 251—256.
62. Pauling L., Corey R.B. // Ibid. P. 256—261.
63. Pauling L., Corey R.B. // Ibid. P. 261—271.
64. Pauling L., Corey R.B. // Ibid. P. 272—281.
65. Pauling L., Corey R.B. // Ibid. P. 282—285.
66. Corey R.B., Donohue J. // J. Amer. Chem. Soc. 1950. Vol. 72. P. 2899—2903.
67. Pauling L., Corey R.B. // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1951. Vol. 37. P. 729—740.
68. Pauling L., Corey R.B. // Ibid. 1952. Vol. 38. P. 86—93.
69. Pauling L., Corey R.B. // Ibid. 1953. Vol. 39. P. 247—252.
70. Pauling L., Corey R.B. // Ibid. P. 253—256.
71. Pauling L. The nature of chemical bond. Cornell: Cornell Univ. press, 1940.
72. Perutz M.F. // Proc. Roy. Soc. London A. 1949. Vol. 195. P. 474—485.
73. Kendrew J.C. // Ibid. 1950. Vol. 201. P. 62—73.
74. Perutz M.F. // Nature. 1951. Vol. 167. P. 1053—1054.
75. MacAthur I. // Ibid. 1943. Vol. 152. P. 38—41.

76. Cochran W., Crick F.H.C. // *Ibid.* 1952. Vol. 169. P. 234—237.
77. Cochran W., Crick F.H.C., Vand V. // *Acta crystallogr.* 1952. Vol. 5. P. 581—592.
78. Riley D.P., Arndt U.W. // *Nature.* 1952. Vol. 169. P. 138—142.
79. Elliott A. // *Ibid.* 1953. Vol. 172. P. 359—362.
80. Price W.C., Fraser R.D.B. // *Proc. Roy. Soc. London B.* 1952. Vol. 141. P. 66—73.
81. Price W.C., Fraser R.D.B. // *Nature.* 1952. Vol. 170. P. 490—492.
82. Mercer E.H., Olofsson B. // *J. Polymer Sci.* 1951. Vol. 6. P. 261—269.
83. Crick F.H.C. // *Nature.* 1952. Vol. 170. P. 882—883.
84. Pauling L., Corey R.B. // *Ibid.* 1953. Vol. 171. P. 59—61.
85. Donohue J. // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1953. Vol. 39. P. 470—478.
86. Low B. // *Proteins.* 1953. Vol. 1A. P. 235—391.
87. Bamford C.H., Brown L., Elliott A. et al. // *Nature.* 1954. Vol. 173. P. 27—29.
88. Brown L., Trotter I.F. // *Trans. Faraday Soc.* 1956. Vol. 52. P. 537—548.
89. Elliott A., Malcolm B.R. // *Proc. Roy. Soc. London A.* 1959. Vol. 249. P. 30—41.
90. Linderstrom—Lang K.U. // *Proteins and enzymes.* Stanford Univ. press, Stanford, Calif. 1952. P. 93—112. (Lane med. lect.; Vol. 6).
91. Linderstrom—Lang K., Schellman J.A. // *Biochim. et biophys. acta.* 1954. Vol. 15. P. 156—163.
92. Low B.W. // *III Biochem., congr., Brussels, 1955: Proceedings.* Brussels, 1955. Vol. 5. P. 114—115.
93. Lindley H., Kollett J.S. // *Biochim. et biophys. acta.* 1955. Vol. 18. P. 183—191.
94. Seta M., Lifson S. // *Ibid.* 1959. Vol. 36. P. 471—479.
95. Scheraga H.A. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1960. Vol. 82. P. 3847—3865.
96. Parks J.M. // *Protein structure and function: Brookhaven, 1961.* P. 132—135. (Brookhaven Symp.; Vol. 13.).
97. Hanby W.E., Waley S.G., Watson J.S. // *Nature.* 1948. Vol. 161. P. 132.
98. Elliott A., Malcolm B.R., Hanby W.E. // *Ibid.* 1957. Vol. 179. P. 963—965.
99. Blout E.R., Lenormant H. // *Ibid.* P. 960—962.
100. Blout E.R., Idelson M. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1958. Vol. 80. P. 4909—4915.
101. Doty P., Imahori K., Klemperer E. // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1958. Vol. 44. P. 424.
102. Lenormant H., Bandras A., Blout E.R. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1958. Vol. 80. P. 6191—6194.
103. Blout E.R., De Loze C., Bloom S.M. et al. // *Ibid.* 1960. Vol. 82. P. 3787—3795.
104. Fasman G.D., Blout E.R. // *Ibid.* P. 2262—2267.
105. Bohak Z., Katchalski E. // *Biochemistry.* 1963. Vol. 2. P. 228—235.
106. Elliott A., Bradbury E.M., Downie A.R. et al. *Polyamino acids, polypeptides and proteins* / Ed. M. Stahmann. Madison: Univ. Wis. press, 1962. P. 255—273.
107. Doty P., Bradbury J.H., Holtzer A.M. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1954. Vol. 76. P. 4493—4498.
108. Doty P., Gratzner W.B. // *Polyamino acids, polypeptides and proteins* / Ed. M. Stahmann. Madison: Univ. Wis. press, 1962. P. 111—119.
109. Blout E.R. // *Ibid.* P. 275—279.
110. Schellman J.A., Schellman Ch. // *The protein* / Ed. H. Henrath. N.Y.: Acad. press, 1964. Vol. 2. P. 1—137.
111. Fasman G.D. // *Polyamino acids, polypeptides and proteins* / Ed. M. Stahmann. Madison: Univ. Wis. press, 1962. P. 201—217.
112. Fasman G.D. // *Poly- α -amino acids* / Ed. M. Goodman. N.Y.: Dekker, 1967. P. 499—604.
113. Fasman G.D., Lindblow C., Bodenheimer E. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1962. Vol. 84. P. 4979—4985.
114. Fasman G.D., Lindblow C., Bodenheimer E. // *Abstr. Fed. Proc.* 1962. Vol. 21. P. 401B.
115. Gratzner W.B., Doty P. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1963. Vol. 85. P. 1193—1198.
116. Schellman J.A. // *C.r. Lab. Carlsberg. Ser. Chim.* 1955. Vol. 29. P. 223—232.
117. Klotz I.M., Fransen J.S. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1960. Vol. 82. P. 5241—5248.
118. Klotz I.M., Fransen J.S. // *Ibid.* 1962. Vol. 84. P. 3461—3466.
119. Harrington W.F., Schellman J.A. // *C.r. Lab. Carlsberg. Ser. Chim.* 1956. Vol. 30. P. 21—39.
120. Edsall J.T., Wyman J. // *Biophys. Chem.* 1958. Vol. 1. P. 124—131.
121. Fasman G.D., Blout E.R. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1960. Vol. 82. P. 2262—2267.

122. Nemethy G., Phillips D.C., Leach S.J. et al. // *Nature*. 1967. Vol. 214. P. 363—365.
123. Bloom S.M., Fasman G.D., de Loze C. et al. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1962. Vol. 84. P. 458—465.
124. Fraser R.D.B., Harrap B.S., MacRac T.P. et al. // *J. Mol. Biol.* 1965. Vol. 12. P. 482—495.
125. Fraser R.D.B., MacRac T.P., Stewart F.H.C. et al. // *Ibid.* Vol. 11. P. 706—720.
126. Fraser R.D.B., Harrap B.S., MacRac T.P. et al. // *Biopolymers*. 1967. Vol. 5. P. 251—256.
127. Bamford C.H., Elliott A., Hanby W.E. *Synthetic polypeptides*. N.Y.: Acad. press, 1956.
128. Doty P., Holtzer A.M., Bradbury J.H. et al. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1954. Vol. 76. P. 4493—4499.
129. Doty P., Bradbury J.H., Holtzer A.M. // *Ibid.* 1956. Vol. 78. P. 947—953.
130. Blout E.R., Asadourian A. // *Ibid.* P. 955—963.
131. Goodman M., Schmitt E.E. // *Ibid.* 1959. Vol. 81. P. 5507—5515.
132. Goodman M., Schmitt E.E., Yphantis D. // *Ibid.* 1960. Vol. 82. P. 3483—3488.
133. Goodman M. // *J. Polymer Sci.* 1961. Vol. 49. P. 150—160.
134. Goodman M., Schmitt E.E., Yphantis D. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1962. Vol. 84. P. 1288—1292.
135. Goodman M., Listowsky I., Schmitt E.E. // *Ibid.* P. 1296—1301.
136. Goodman M., Deber C.M., Felix A.M. // *Ibid.* P. 3771—3773.
137. Goodman M., Deber C.M., Felix A.M. // *Ibid.* P. 3773—3776.
138. Goodman M., Listowsky I., Masuda Y. et al. // *Biopolymers*. 1963. Vol. 1. P. 33—41.
139. Goodman M., Boardman F. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1963. Vol. 85. P. 2483—2486.
140. Goodman M., Boardman F., Listowsky I. // *Ibid.* P. 2491—2495.
141. Goodman M., Felix A.M., Deber C.M. et al. // *Biopolymers*. 1963. Vol. 1. P. 371—380.
142. Goodman M., Masuda Y. // *Ibid.* 1964. Vol. 2. P. 100—107.
143. Goodman M., Rosen I.G. // *Ibid.* P. 537—542.
144. Goodman M., Longsam M., Rosen I.G. // *Ibid.* 1966. Vol. 4. P. 305—309.
145. Blout E.R., De Loze C., Bloom S.M. et al. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1962. Vol. 84. P. 458—465.
146. Auer H.E., Doty P. // *Biochemistry*. 1966. Vol. 5. P. 1716—1720.
147. Bradbury E.M., Brown L., Downie A.R. et al. // *J. Mol. Biol.* 1960. Vol. 2. P. 276—283.
148. Bradbury E.M., Brown L., Downie A.R. et al. // *Nature*. 1959. Vol. 183. P. 173—175.
149. Fraser R.D.B., MacRac T.P., Stapleton I.W. // *Ibid.* 1962. Vol. 193. P. 573—574.
150. Bamford C.H., Hanby W.E., Happey F. // *Proc. Roy. Soc. London A.* 1951. Vol. 205. P. 30—41.
151. Bamford C.H., Brown L., Elliott A. et al. // *Nature*. 1952. Vol. 169. P. 357—360.
152. Ambrose E.J., Elliott A. // *Proc. Roy. Soc. London A.* 1951. Vol. 205. P. 47—59.
153. Blout E.R., Karlson R.H. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1958. Vol. 80. P. 1259—1265.
154. Karlson R.H., Norland R.S., Fasman G.D. et al. // *Ibid.* 1960. Vol. 82. P. 2268—2273.
155. Blout E.R. // *Tetrahedron*. 1961. Vol. 13. P. 123—134.
156. Luzzati V., Cesari M., Spach G. et al. // *J. Mol. Biol.* 1961. Vol. 3. P. 566—571.
157. Luzzati V., Cesari M., Spach G. et al. // *Polyamino acids, polypeptides and proteins* / Ed. M. Stahmann. Madison: Univ. Wis. press. 1962. P. 121—130.
158. Cowan P.M., MacGavin S. // *Nature*. 1955. Vol. 176. P. 501—503.
159. Cowan P.M., McGavin S., North A.C.T. // *Ibid.* P. 1062—1064.
160. Sasisekharan V. // *Acta crystallogr. A.* 1959. Vol. 12. P. 897—902.
161. Sasisekharan V. // *Ibid.* P. 903—910.
162. Katchalski E., Steinberg I.Z. // *Annu. Rev. Phys. Chem.* 1961. Vol. 12. P. 433—441.
163. Katchalski E., Sela M. // *Adv. Protein Chem.* 1958. Vol. 13. P. 243—270.
164. Sela M., Katchalski E. // *Ibid.* 1959. Vol. 14. P. 391—412.
165. Downie A.R., Rundall A.A. // *Trans. Faraday Soc.* 1959. Vol. 55. P. 2132—2138.
166. Traub W., Shmueli U. // *Aspects of protein structure* / Ed. G.N. Ramachandran. N.Y.: Acad. press, 1963. P. 81—110.
167. Szent-Gyorgyi A.G., Cohen C. // *Science*. 1957. Vol. 126. P. 697—704.
168. Crik F.H.C., Rich A. // *Nature*. 1955. Vol. 176. P. 780—782.
169. Meggy A.B., Sikorski J. // *Ibid.* 1956. Vol. 177. P. 326—328.

170. Bragg W.L. The X-ray analysis of biological molecules: Address to the Lisbon Academy of Sciences. Lisbon: Acad. sci., 1963.
171. Dickerson R.E. The protein. N.Y.: Acad. press, 1964.
172. Patterson A.L. // Phys. Rev. 1934. Vol. 46. P. 372—396.
173. Robertson J.M., Woodward I. // J. Chem. Soc. 1937. N 1. P. 219—230.
174. Holmes K.C., Blow D.M. The use of X-ray diffraction in the study of protein and nucleic acid structure. N.Y.: Interscience, 1966.
175. Bragg W.L. // Nature. 1939. Vol. 143. P. 73—74.
176. Robertson J.M. // Ibid. P. 75—76.
177. Crowfoot D. // Proc. Roy. Soc. London A. 1938. Vol. 164. P. 580—591.
178. Crowfoot D. // Chem. Rev. 1941. Vol. 28. P. 215—231.
179. Kendrew J.C. // Acta crystallogr. A. 1948. Vol. 1. P. 336—340.
180. Bernal J.D. // Nature. 1939. Vol. 143. P. 74—75.
181. Perutz M.F. // Ibid. 1942. Vol. 149. P. 491—493.
182. Perutz M.F. // Proc. Roy. Soc. London A. 1949. Vol. 195. P. 474—485.
183. Perutz M.F. // Nature. 1939. Vol. 143. P. 731—733.
184. Perutz M.F. // Ibid. 1942. Vol. 150. P. 324—326.
185. Boyes-Watson J., Davidson E., Perutz M.F. // Proc. Roy. Soc. London A. 1947. Vol. 191. P. 83—97.
186. Perutz M.F. // Trans. Faraday Soc. 1946. Vol. 42. P. 187—202.
187. Perutz M.F. // Proc. Roy. Soc. London A. 1949. Vol. 195. P. 474—490.
188. Bragg W.L., Perutz M.F. // Acta crystallogr. A. 1952. Vol. 5. P. 277—322.
189. Bragg W.L., Perutz M.F. // Ibid. P. 323—341.
190. Kendrew J.C. // Proc. Roy. Soc. London A. 1959. Vol. 237. P. 62—85.
191. Kendrew J.C., Pauling P.J. // Ibid. P. 255—266.
192. Arndt U.W., Riley D.P. // Philos. Trans. Roy. Soc. London A. 1955. Vol. 247. P. 409—417.
193. Cohen C., Szent-Gyorgyi A. // J. Amer. Chem. Soc. 1957. Vol. 79. P. 248—252.
194. Bragg W.L., Perutz M.F. // Proc. Roy. Soc. London A. 1954. Vol. 225. P. 315—322.
195. Creen D.W., Ingram V.M., Perutz M.F. // Ibid. P. 287—296.
196. Бландел Т., Джонсон Л. Кристаллография белка. М.: Мир. 1979.
197. McRec D.E. Practical protein crystallography. N.Y.: Acad. press, 1933. 386 p.
198. Kendrew J.C., Parrish R.G. // Proc. Roy. Soc. London A. 1956. Vol. 238. P. 305—312.
199. Kendrew J.C., Pauling P.J. // Ibid. Vol. 237. P. 255.
200. Kendrew J.C., Bodo G., Dintzis H.M. et al. // Nature. 1958. Vol. 181. P. 662—664.
201. Bodo G., Dintzis H.M., Kendrew J.C. et al. // Proc. Roy. Soc. London A. 1959. Vol. 253. P. 70—81.
202. Bragg W.L. // Rep. Progress Phys. 1965. Vol. 28. P. 4—26.
203. Kendrew J.C., Dickerson R.E., Strandberg B.E. et al. // Nature. 1960. Vol. 185. P. 422—423.
204. Kendrew J.C., Watson H.C., Strandberg B.E. et al. // Ibid. 1961. Vol. 190. P. 666—668.
205. Kendrew J.C. // Brookhaven Symp. Biol. 1962. Vol. 15. P. 216—220.
206. Perutz M.F., Rossmann M.G., Cullis A.F. et al. // Nature. 1960. Vol. 185. P. 416—418.
207. Cullis A.F., Muirhead H., Perutz M.F., et al. // Proc. Roy. Soc. London A. 1961. Vol. 265. P. 15—26.
208. Perutz M.F., Muirhead H., Cox J.M. et al. // Nature. 1968. Vol. 219. P. 131—139.
209. Kauzmann W. Mechanism of enzyme action. Baltimore (Md.): Johns Hopkins Univ. press, 1954.
210. Kauzmann W. // Adv. Protein Chem. 1959. Vol. 15. P. 1—63.
211. Perutz M.F., Kendrew J.C., Watson H.C. // J. Mol. Biol. 1965. Vol. 13. P. 669—680.
212. Blake C.C.F., Fenn R.H., North A.C.T. et al. // Nature. 1962. Vol. 196. P. 1173—1176.
213. Blake C.C.F., Fenn R.H., Koenig D.F. et al. // VI Congr. Intern., Union crystallogr.: Abstracts. Rome, 1963. P. 23.
214. Blake C.C.F., Fenn R.H., Koenig D.F. et al. // Acta crystallogr. A. 1963. Vol. 16. P. 77.
215. Blake C.C.F., Koenig D.F., Mair G.A. et al. // Nature. 1965. Vol. 206. P. 757—763.
216. Phyllips D.C. // Adv. Res. Differ. Meth. 1966. Vol. 2. P. 75—97.
217. Phyllips D.C. // Sci. Amer. 1966. N 11. P. 78—90.
218. Молекулы и клетки. М.: Мир, 1968. 361 с.

219. Blake C.C.F., Johnson L.N., Mair G.A. et al. // Proc Roy. Soc. London B. 1967. Vol. 167. P. 378—391.
220. Phyllips D.C. // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1967. Vol. 57. P. 493—497.
221. Phyllips D.C. // Ibid. P. 484—493.
222. Vernon C.A. // Proc. Roy. Soc. London B. 1967. Vol. 167. P. 389—401.
223. Ford L.O., Johnson L.N., Machin P.A. et al. // J. Mol. Biol. 1974. Vol. 88. P. 349—371.
224. Haldane J.B.S. Enzymes. L.: Lougmans, 1930. 284 p.
225. Pauling L. // Chem. Eng. News. 1946. Vol. 24. P. 1375—1383.
226. Eyring H., Lumry R., Spikes J.D. // The mechanism of enzyme action. Baltimore (Md.): Johns Hopkins Univ. press, 1954. P. 123—150.
227. Lumry R. // Enzymes. 1959. Vol. 1. P. 157—231.
228. Wyckoff H.W., Hardman K.D., Allewell N.M. et al. // J. Biol. Chem. 1967. Vol. 242. P. 3749—3756.
229. Wyckoff H.W., Hardman K.D., Allewell N.M. et al. // Ibid. P. 3984—4001.
230. Kartha G., Bello J., Harker D. // Nature. 1967. Vol. 213. P. 862—867.
231. Matthews B.W., Sigler P.B., Henderson R., Blow D.M. // Ibid. Vol. 214. P. 652—656.
232. Reeke G.N., Hurtsuck J.A., Ludwig M.L., Lipscomb W.N. // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1967. Vol. 58. P. 2220—2226.
233. Protein Data Bank. Quart. Newslett. 1994. Release 69. P. 1.
234. Singer S.J., Nicolson G.L. // Science. 1972. Vol. 175. P. 720—731.
235. Bretscher M.S., Raff M.C. // Nature. 1975. Vol. 258. P. 43—49.
236. Helenius A., Simons K. // Biochim. et biophys. acta. 1975. Vol. 415. P. 29—79.
237. Bretscher M. // Science. 1973. Vol. 181. P. 622—629.
238. Steck T.L. // J. Cell Biol. 1974. Vol. 62. P. 1—19.
239. Marchesi V.T. // J. Membr. Biol. 1979. Vol. 51. P. 101—131.
240. Branton D., Cohen C.M., Tyler J. // Cell. 1981. Vol. 24. P. 24—32.
241. Marchesi V.T., Furthmayr H., Tomita M. // Annu. Rev. Biochem. 1976. Vol. 45. P. 667—698.
242. Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж. и др. Молекулярная биология клетки. М.: Мир, 1986. Т. 2.
243. Steck T.L. // J. Supramol. Struct. 1978. Vol. 8. P. 311—324.
244. Cabantchik Z.I., Knauf P.A., Rothstein A. // Biochim. et biophys. acta. 1978. Vol. 515. P. 239—302.
245. Henderson R., Unwin P.N.T. // Nature. 1975. Vol. 258. P. 28—32.
246. Deisenhofer J., Epp O., Miki K. et al. // J. Mol. Biol. 1984. Vol. 180. P. 385—398.
247. Allen J.P. // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1987. Vol. 84. P. 5370—5376.
248. Weiss M.S., Kreusch A., Schiltz E. et al. // FEBS Lett. 1991. Vol. 280. P. 379—382.
249. de Vas A.M., Ultsch M., Kossiakoff A.A. // Science. 1992. Vol. 255. P. 306—312.
250. Milburn M.V., Prive G.G., Milligan D.L. et al. // Ibid. 1991. Vol. 252. P. 1342—1347.
251. Ullrich A., Coussens L., Haftlick J.S. et al. // Nature. 1984. Vol. 309. P. 418—422.
252. Claesson-Welsh L., Eriksson A., Morén A. et al. // Mol. and Cell. Biol. 1988. Vol. 8. P. 3476—3486.
253. Ebina Y., Ellis L., Jarnagin K. et al. // Cell. 1985. Vol. 40. P. 747—752.
254. Yamamoto T., Davis C.G., Brown M.S. et al. // Ibid. 1984. Vol. 38. P. 615—622.
255. Russo A.F., Koshland D.E. // Science. 1983. Vol. 220. P. 1016—1025.
256. Krikos A., Mutoh N., Boyd A. et al. // Cell. 1983. Vol. 33. P. 615—620.
257. Jancarik J., Scott W.G., Milligan D.L. et al. // J. Mol. Biol. 1991. Vol. 221. P. 31—40.
258. Smith W.L., Borgeat P., Fitzpatrick F.A. // Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes / Ed. D.F. Vance, J. Vance. N.Y.: Elsevier, 1991. P. 297—325.
259. Marnett L.J. // Environ. and Health Perspect. 1990. Vol. 88. P. 5—12.
260. Makheja A.N. // Mol. and Cell. Biochem. 1992. Vol. 111. P. 137—142.
261. Picot D., Loll P.J., Garavito R.M. // Nature. 1994. Vol. 367. P. 243—249.
262. Blobel G. // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1980. Vol. 77. P. 1496—1500.
263. Greaves M.F., Owen J.J., Raff M.C. T and B lymphocytes: origins, properties and roles in immune responses. Amsterdam: Excerpta Medica, 1973.
264. Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж. и др. Молекулярная биология клетки. М.: Мир, 1987. Т. 5.

265. Burnet F.M. The clonal selection theory of acquired immunity. Nashville (Tn.): Vanderbilt Univ. press, 1959.
266. Biere B.E., Sleckman B.P., Ratnofsky S.E., Burakoff S.J. // *Annu. Rev. Immunol.* 1989. Vol. 7. P. 579—599.
267. Cantor H., Gershon R.K. // *Fed. Proc.* 1979. Vol. 38. P. 2058—2064.
268. Zinkernagel R.M. // *Hosp. Pract.* 1978. Vol. 13. P. 83—92.
269. Davies A.J.S. // *Transplant. Rev.* 1969. Vol. 1. P. 43—91.
270. Paul W.E., Sredni B., Schwartz R.H. // *Nature.* 1981. Vol. 294. P. 697—699.
271. Gershon R.K. // *Contemp. Top. Immunobiol.* 1974. Vol. 3. P. 1—40.
272. Billingham R., Silvers W. The immunobiology of transplantation. Englewood Cliffs (N.Y.): Prentice—Hall, 1971. (Foundation of Immunology Ser.).
273. Klein J., Juretic A., Constantin N.B., Nagy Z.A. // *Nature.* 1981. Vol. 291. P. 455—460.
274. Benacerraf B.A. // *J. Immunol.* 1978. Vol. 120. P. 1809—1812.
275. Sprent J. // *Immunol. Rev.* 1978. Vol. 42. P. 108—137.
276. Ploegh H.L., Orr H.T., Strominger J.L. // *Cell.* 1981. Vol. 24. P. 287—299.
277. Strominger J.L. // The role of the major histocompatibility complex in immunobiology / Ed. M.E. Dorf. N.Y.: Garland STPM, 1981. P. 115—172.
278. Zinkernagel R.M., Doherty P.C. // *Adv. Immunol.* 1979. Vol. 27. P. 51—177.
279. Zinkernagel R.M. // *Hosp. Pract.* 1978. Vol. 13. P. 83—92.
280. Ramsdell F., Fowlkes B.J. // *J. Immunol.* 1989. Vol. 143. P. 1467—1471.
281. Zuniga-Pflucker J.C., Jones L.A., Longo D.L. et al. // *J. Exp. Med.* 1990. Vol. 171. P. 427—437.
282. Fung-Leung W., Schilham M.W., Rahemtulla A. et al. // *Cell.* 1991. Vol. 65. P. 443—449.
283. Swain S.L. // *Immunol. Rev.* 1983. Vol. 74. P. 129—142.
284. Dembic Z., Haas W., Zamoyska R. et al. // *Nature.* 1987. Vol. 326. P. 510—511.
285. Gabert J., Langlet C., Zamoyska R. et al. // *Cell.* 1987. Vol. 50. P. 545—554.
286. Norment A.M., Littman D.R. // *EMBO J.* 1988. Vol. 7. P. 3433—3439.
287. Rosenstein Y., Ratnojsky S., Burakoff S.J. et al. // *J. Exp. Med.* 1989. Vol. 169. P. 149—160.
288. Salter R.D., Benjamin R.J., Wesley P.K. et al. // *Nature.* 1990. Vol. 345. P. 41—46.
289. Sanders S.K., Fox R.O., Kavathas P. // *J. Exp. Med.* 1991. Vol. 174. P. 371—379.
290. Veillette A., Bookman M.A., Horak E.M. et al. // *Cell.* 1988. Vol. 55. P. 301—308.
291. Littman D.R., Thomas Y., Maddon P. et al. // *Ibid.* 1985. Vol. 240. P. 237—246.
292. Norment A.M., Littman D.R. // *EMBO J.* 1988. Vol. 7. P. 3433—3439.
293. Leahy D.J., Axel R., Hendrickson W.A. // *Cell.* 1992. Vol. 68. P. 1145—1162.
294. Bjorkman P.J., Saper M.A., Samraoui B. et al. // *Nature.* 1987. Vol. 329. P. 506—512.
295. Salter R.D., Benjamin R.J., Wesley P.K. et al. // *Ibid.* 1990. Vol. 345. P. 41—46.
296. Brown J.H., Jardetsky T., Saper M.A. et al. // *Ibid.* 1988. Vol. 332. P. 845—850.
297. Lange G., Lewis S.J., Murshudov G.N. et al. // *Structure.* 1994. Vol. 2. P. 469—481.
298. Wang J., Yan Y., Garrett T.P.J. et al. // *Nature.* 1990. Vol. 348. P. 411—418.
299. Garrett T.P.J., Wang J., Yan Y. et al. // *J. Mol. Biol.* 1993. Vol. 234. P. 763—778.
300. Brady R.L., Dodson E.J., Dodson G.G. et al. // *Science.* 1993. Vol. 260. P. 979—983.
301. Gammarota G., Scheirle A., Takacs B. et al. // *Nature.* 1992. Vol. 356. P. 799—801.
302. Potter T.A., Rajan T.V., Dick R.F. et al. // *Ibid.* 1989. Vol. 337. P. 73—75.
303. Salter R.D., Benjamin R.J., Wesley P.K. et al. // *Ibid.* 1990. Vol. 345. P. 41—46.
304. Maddon P.J., Littman D.R., Godfrey M. et al. // *Cell.* 1985. Vol. 42. P. 93—104.
305. Capon D.J., Chamow S.M., Mordenti J. et al. // *Nature.* 1989. Vol. 337. P. 525—531.
306. Klatzmann D., Champagne E., Chamaret S. et al. // *Ibid.* 1984. Vol. 312. P. 767—768.
307. Dalgleish A.G., Beverley P.C.L., Clapham P.R. et al. // *Ibid.* P. 763—767.
308. Williams A.F., Davis S.J., He Q. et al. // *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 1989. Vol. 54. P. 637—647.
309. Kwong P.D., Ryu S.-E., Hendrickson W.A. et al. // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1990. Vol. 87. P. 6423—6427.
310. Davis S.J., Ward H.A., Puklavec M.J. et al. // *J. Biol. Chem.* 1990. Vol. 265. P. 10410—10418.
311. Hunt D.F., Michel H., Dickinson T.A. et al. // *Science.* 1992. Vol. 256. P. 1817—1820.
312. Chicz R.M., Urban R.G., Gorga J.C. et al. // *J. Exp. Med.* 1993. Vol. 178. P. 27—47.
313. Tiwari J.L., Terasaki P.J. HLA and disease associations. N.Y.: Springer, 1985.

314. Todd J.A. // *Science*. 1988. Vol. 240. P. 1003—1009.
315. Gorga J.C., Brown J.H., Jardetzky T. et al. // *Res. Immun.* 1991. Vol. 142. P. 401—407.
316. Brown J.H., Jardetzky T., Gorga J.C. et al. // *Nature*. 1993. Vol. 364. P. 33—39.
317. Bjorkman P.J., Saper M.A., Samraoni B. et al. // *Ibid.* 1987. Vol. 329. P. 506—512.
318. Brown J.H., Jardetzky T., Saper M.A. et al. // *Ibid.* 1988. Vol. 332. P. 845—850.
319. Konig R., Huang L.-Y., Germain R.N. // *Ibid.* 1992. Vol. 356. P. 796—798.
320. Jorgensen J.L., Reay P.A., Ehrlich E.W. et al. // *Annu. Rev. Immunol.* 1992. Vol. 10. P. 835—873.
321. Germain R.N., Margulies D.H. // *Ibid.* 1993. Vol. 11. P. 403—450.
322. Falk K., Rotzschke O., Stevanovic S. et al. // *Nature*. 1991. Vol. 351. P. 290—296.
323. Hunt D.F. // *Science*. 1992. Vol. 256. P. 1261—1263.
324. Jardetzky T.S., Lane W.S., Robinson R.A. et al. // *Nature*. 1991. Vol. 353. P. 326—329.
325. Rudensky A.Y., Preston-Huriburt P., Al-Ramadi B.K. // *Ibid.* 1992. Vol. 359. P. 429—431.
326. Chicz R.M., Urban R.G., Lane W.S. et al. // *Ibid.* Vol. 358. P. 764—768.
327. Hammer J., Valsasini P., Tolba K. et al. // *Cell*. 1993. Vol. 74. P. 197—203.
328. Sette A., Sidney J., Oseroff C. et al. // *J. Immunol.* 1993. Vol. 151. P. 3163—3170.
329. Madden D.R., Gorga J.C., Strominger J.L. et al. // *Nature*. 1991. Vol. 353. P. 321—325.
330. Madden D.R., Gorga J.C., Strominger J.L. et al. // *Cell*. 1992. Vol. 70. P. 1035—1048.
331. Silver M.L., Guo H.-C., Strominger J.L. et al. // *J. Biol. Chem.* 1992. Vol. 360. P. 367.
332. Madden D.R., Garboczi D.N., Wiley D.C. // *Cell*. 1993. Vol. 75. P. 693—708.
333. Zhang W., Young A.C.M., Imarai M. et al. // *Proc. Nat. Acad. Sci. US*. 1992. Vol. 89. P. 8403—8407.
334. Young A.C.M., Zhang W., Sacchettini J.C. et al. // *Cell*. 1994. Vol. 76. P. 39—50.
335. Fremont D.H., Matsumura M., Stura E.A. et al. // *Science*. 1992. Vol. 257. P. 919—927.
336. Madden D.R., Wiley D.C. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1992. Vol. 2. P. 300—304.
337. Matsumura M., Fremont D.H., Peterson P.A. et al. // *Science*. 1992. Vol. 257. P. 927—934.
338. Stern L.J., Brown J.H., Jardetzky T.S. et al. // *Nature*. 1994. Vol. 386. P. 215—221.
339. Andreeva N.S., Gustchina A.E., Fedorov A.A. et al. // *Adv. Exp. Med. and Biol.* 1977. Vol. 95. P. 23—31.
340. Андреева Н.С., Федоров А.А., Гущина А.Е. и др. // *Молекуляр. биология*. 1978. Т. 12. С. 922—935.
341. Андреева Н.С., Жданов А.С., Федоров А.А. и др. // *Там же*. 1984. Т. 18. С. 313—322.
342. Sielecki A.R., Fedorov A.A., Boodhoo A. et al. // *J. Mol. Biol.* 1990. Vol. 214. P. 148—170.
343. Cooper J.B., Khan G., Taylor G. et al. // *Ibid.* P. 199—222.
344. Andreeva N.S., Zdanov A.S., Gustchina A.E. et al. // *J. Biol. Chem.* 1984. Vol. 259. P. 11353—11365.
345. James M.H.G., Sielecki A.R. // *Nature*. 1986. Vol. 319. P. 33—38.
346. Hartsuck J.A., Remington S.J. // *Abstr. 18th Linderstrom-Lang conf. on aspartic proteinases* (4—8 July, 1988, Elsinore, Spain). 1988. P. 40.
347. Сафро М.Г., Андреева Н.С., Жданов А.С. // *Молекуляр. биология*. 1985. Т. 19. С. 400—411.
348. Gilliland G.L., Winborne E.L., Nuchman J., Wlodawer A. // *Abstr. 18th Linderstrom-Lang conf. on aspartic proteinases* (4—8 July, 1988, Elsinore, Spain). 1988. P. 29.
349. Gilliland G.L., Winborne E.L., Nuchman J. et al. // *Proteins*. 1990. Vol. 8. P. 82—101.
350. Sielecki A.R., Hayakawa E., Fuginaga M. et al. // *Science*. 1989. Vol. 241. P. 1346—1351.
351. Rahuel J., Priestle J.P., Grutter M.G. // *J. Struct. Biol.* 1991. Vol. 107. P. 227—236.
352. Dhanaraj V., Dealwis C., Frazao C. et al. // *Nature*. 1992. Vol. 357. P. 466—470.
353. Dealwis C.G., Frazao C., Badasso M. et al. // *J. Mol. Biol.* 1994. Vol. 236. P. 342—360.
354. Hanson G.J., Clare M., Summers N.L. et al. // *Bioorg. Med. Chem.* 1994. Vol. 2. P. 909—918.
355. Hsu I.N., Delbaere L.T.J., James M.N.G. et al. // *Ibid.* 1977. Vol. 266. P. 140—145.
356. James M.H.G., Sielecki A.R. // *J. Mol. Biol.* 1983. Vol. 163. P. 229—361.
357. James M.N., Sielecki A.R. // *Biochemistry*. 1985. Vol. 24. P. 3701—3713.
358. James M.N.G., Sielecki A., Salituro F. et al. // *Proc. Nat. Acad. Sci. US*. 1982. Vol. 79. P. 6137—6141.

359. James M.N.G., Sielecki A., Hofmann Th. // Aspartatic proteinases and their inhibitors / Ed. V. Kostka. B.; N.Y.: De Gruyter, 1985. P. 163—177.
360. Subramanian E., Swan I.D.A., Liu M. et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1977. Vol. 74. P. 556—559.
361. Wong Chi-H., Lee T.J., Lu T.-H. // Biochemistry. 1979. Vol. 18. P. 1638—1640.
362. Blundell T., Jenkins J.A., Sewell B.T. // J. Mol. Biol. 1990. Vol. 211. P. 919—941.
363. Cooper J.B., Foundling S., Hemminge A. et al. // Europ. J. Biochem. 1987. Vol. 169. P. 215—221.
364. Sali A., Veerapandian B., Cooper J.B. et al. // EMBO J. 1989. Vol. 8. P. 2179—2188.
365. Cooper J.B., Foundling S., Blundell T.L. et al. // Biochemistry. 1989. Vol. 28. P. 8596—8603.
366. Subramanian E., Lin M., Swan I.D.A., Davies D.R. // Adv. Exp. Med. and Biol. 1977. Vol. 95. P. 33—41.
367. Suguna K., Bott R.R., Padlan E.A. et al. // J. Mol. Biol. 1987. Vol. 196. P. 877—900.
368. Bott R., Subramanian E., Davies D. // Biochemistry. 1982. Vol. 28. P. 6956—6962.
369. Suguna K., Padlan E.A., Smith C.M. et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1987. Vol. 84. P. 7009—7013.
370. Fraser M.E., Hayakawa K., Yoshinaka Y. et al. // Viral proteinases as targets for chemotherapy. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab., 1989.
371. Miller M., Jaskolski M., Rao M.J.K. et al. // Nature. 1989. Vol. 337. P. 576—579.
372. Navia M.A., Fitzgerald P.M.D., McKeever B.M. et al. // Ibid. P. 615—620.
373. Wlodawer A., Miller M., Jaskolski M. et al. // Science. 1989. Vol. 245. P. 616—621.
374. Jaskolski M., Tomasselli A.G., Sawyer T.K. et al. // Biochemistry. 1991. Vol. 30. P. 1600—1609.
375. Swain A.L., Miller M., Green J. et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1990. Vol. 87. P. 8805—8809.
376. Miller M., Schneider J., Sathyanarayana B.K. et al. // Science. 1989. Vol. 246. P. 1149—1152.
377. Sali A., Verapandian B., Cooper J.B. et al. // EMBO J. 1989. Vol. 8. P. 2179—2188.
378. Antonov V.K., Ginodman L.M., Rumsh L.D. et al. // Europ. J. Biochem. 1981. Vol. 117. P. 195—200.
379. Antonov V.K. // Adv. Exp. Med. and Biol. 1977. Vol. 95. P. 179—198.
380. Antonov V.K., Ginodman L.M., Kapitannikov Yu.V. et al. // FEBS Lett. 1978. Vol. 88. P. 87—90.
381. Pearl L., Taylor W. // Nature. 1987. Vol. 329. P. 351—354.
382. Cheng Y.S.E., Yin F.H., Foundling S. et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1990. Vol. 87. P. 9660—9664.
383. Bhat T.N., Baldwin E.T., Liu B. et al. // Struct. Biol. 1994. Vol. 1. P. 552—556.
384. Dilanni C.L., Davis L.J., Holloway M.K. et al. // J. Biol. Chem. 1990. Vol. 265. P. 17348—17354.
385. Tomasselli A.G., Hove W.F., Sawyer T.K. et al. // Chimica Oggi. 1991. May. P. 6—27.
386. Seelmeier S., Schmidt H., Turk V. et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1988. Vol. 85. P. 6612—6616.
387. Kohl N.E., Emini E.A., Schleif W.A. et al. // Ibid. P. 4686—4690.
388. Le Grice S.F.J., Mills J. // EMBO J. 1988. Vol. 7. P. 2547—2552.
389. Leob D.D., Swanstrom R., Everitt L. et al. // Nature. 1989. Vol. 340. P. 397—400.
390. Lin X., Wong R.N.S., Tang J. // J. Biol. Chem. 1989. Vol. 264. P. 4482—4489.
391. Dealwis C.G., Frazao C., Badasso M. et al. // J. Mol. Biol. 1994. Vol. 236. P. 342—360.
392. James M.N.G., Sielecki A. // Biochemistry. 1985. Vol. 24. P. 3701—3713.
393. James M.N.G. // Canad. J. Biochem. 1980. Vol. 58. P. 3701—3713.
394. James M.N.G., Hsu I.N., Delbaere L.T.J. // Nature. 1977. Vol. 267. P. 808—813.
395. Blundell T.L., Jones H.B., Rhan G. et al. // Proc. FEBS Meet. 1980. Vol. 60. P. 281—288.
396. Андреева Н.С., Гущина А.Е., Федоров А.А. // Докл. АН СССР. 1981. Т. 259. С. 1284—1290.
397. Foltmann B. // Essays Biochem. 1981. Vol. 17. P. 52—84.
398. Pearl L. // FEBS Lett. 1987. Vol. 214. P. 8—12.
399. Дженкс В. Катализ в химии и энзимологии. М.: Мир, 1972. 467 с.
400. Попов Е.М. // Молекуляр. биология. 1977. Т. 11. С. 5—41.

401. Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж. и др. Молекулярная биология клетки. М.: Мир, 1986. Т. 2.
402. Kornberg R.D. // Science. 1974. Vol. 184. P. 868—871.
403. Kornberg R.D., Thomas J.O. // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1975. Vol. 72. P. 2626—2630.
404. Simpson R.T. // Biochemistry. 1978. Vol. 17. P. 5524—5530.
405. Klug A., Rhodes D., Smith J. et al. // Nature. 1980. Vol. 287. P. 508—516.
406. Oudet P., Gross-Bellard M., Chambon P. // Cell. 1975. Vol. 4. P. 281—300.
407. Thoma F., Koller T., Klug A. // J. Cell Biol. 1979. Vol. 83. P. 403—427.
408. Isenberg I. // Annu. Rev. Biochem. 1979. Vol. 48. P. 159—191.
409. Baldwin J.P., Boseley P.G., Bradbury E.M. et al. // Nature. 1975. Vol. 253. P. 245—249.
410. Perez-Grau L., Bordes J., Koch M.H.J. // Nucl. Acids Res. 1984. Vol. 12. P. 2987—2996.
411. Bentley G.A., Lewit-Bentley A., Finch J.T. et al. // J. Mol. Biol. 1984. Vol. 176. P. 55—75.
412. Finch J.T., Lutter L.C., Rhodes D. et al. // Nature. 1977. Vol. 269. P. 29—36.
413. Finch J.T., Brown R.S., Rhodes D. et al. // J. Mol. Biol. 1981. Vol. 145. P. 757—769.
414. Richmond T.J., Finch J.T., Rushton B. et al. // Nature. 1984. Vol. 311. P. 532—537.
415. Burlingame R.W., Love W.E., Moudrianakis E.N. // Science. 1984. Vol. 223. P. 413—414.
416. Burlingame R.W., Love W.E., Wang Bi-Chi et al. // Ibid. 1985. Vol. 228. P. 546—553.
417. Wang Bi-Chi., Rose J., Arents G. et al. // J. Mol. Biol. 1994. Vol. 236. P. 179—188.
418. Arents G., Burlingame R.W., Wang Bi-Chi et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1991. Vol. 88. P. 10148—10152.
419. Wang J.C. // J. Mol. Biol. 1971. Vol. 55. P. 523—533.
420. DiGate R.J., Mariani K. // J. Biol. Chem. 1989. Vol. 264. P. 17924—17930.
421. Wallis J.W., Chrebet G., Estesky G. et al. // Cell. 1989. Vol. 58. P. 409—419.
422. Kim R.A., Wang J.C. // J. Biol. Chem. 1992. Vol. 267. P. 17178—17185.
423. Kikuchi A., Asai K. // Nature. 1984. Vol. 309. P. 677—681.
424. Confalonieri F., Elie C., Nadal M. et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1993. Vol. 90. P. 4753—4757.
425. Kornberg A., Beker T. DNA replication. N.Y.: Freeman, 1992.
426. Lima Ch.D., Wang J.C., Mondragon A. // Nature. 1994. Vol. 367. P. 138—146.
427. Tse-Dinh V.-C., Beran-Steez R.K. // J. Biol. Chem. 1988. Vol. 263. P. 15857—15859.
428. Lynn R., Wang J.C. // Protein. 1989. Vol. 6. P. 231—239.
429. Tse-Dinh V.-C. // J. Biol. Chem. 1991. Vol. 266. P. 14217—14220.
430. Lima C.D., Wang J.C., Mondragon A. // J. Mol. Biol. 1993. Vol. 232. P. 1213—1216.
431. Шульц Г., Ширмер П. Принципы структурной организации белков. М.: Мир, 1982.
432. Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж. и др. Молекулярная биология клетки. М.: Мир, 1986. Т. 1.
433. Champoux J.J. // DNA topology and its biological effects/Ed. N.R. Cozzarelli, J.C. Wang. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab., 1990. P. 217—242.
434. Попов Е.М. Структурно-функциональная организация белков. М.: Наука. 1992.
435. Jacobson R.H., Zhang X.-J., Du Bose R.F., Matthews B.W. // Nature. 1994. Vol. 369. P. 761—766.
436. Ring M., Huber R.E. // Arch. Biochem. and Biophys. 1990. Vol. 283. P. 342—350.
437. Cupples C.G., Miller J.H., Huber R.E. // J. Biol. Chem. 1990. Vol. 265. P. 5512—5518.
438. Vale R.D., Goldstein L.S.B. // Cell. 1990. Vol. 60. P. 883—890.
439. Huxley H.E. // Biochim. et biophys. acta. 1953. Vol. 12. P. 387—394.
440. Huxley H.E., Hanson J. // Nature. 1954. Vol. 173. P. 973—976.
441. Engelhardt V.A., Ljubimova M.N. // Ibid. 1939. Vol. 144. P. 663—666.
442. Катц Б. Нерв, мышца и синапс. М.: Мир, 1969.
443. Huxley H.E. // Science. 1969. Vol. 164. P. 1356—1366.
444. Huxley H.E. Reflections on muscle. Princeton. (N.Y.): Princeton Univ. press, 1980.
445. Squire J. The structural basis of muscle contraction. N.Y.: Plenum press, 1981.
446. Henderson R., Baldwin J.M., Ceska T.A. et al. // J. Mol. Biol. 1990. Vol. 213. P. 899—929.
447. Kuhlbrandt W., Wang D.N., Fugiyoshi Y. // Nature. 1994. Vol. 367. P. 614—621.
448. Holmes K.C. // Structure. 1994. Vol. 2. P. 589—593.
449. Fisher A.J., Johnson J.E. // Nature. 1993. Vol. 361. P. 176—179.
450. Cheng R.H., Reddy V.S., Olson N.H. et al. // Structure. 1994. Vol. 2. P. 271—282.
451. Wang G., Porta C., Chen Z. et al. // Nature. 1992. Vol. 355. P. 275—278.

452. Holmes K.C., Popp D., Gebhard W., Kabsch W. // *Ibid.* 1990. Vol. 347. P. 44–49.
453. Kabsch W., Mannherz H.G., Suck D. et al. // *Ibid.* P. 37–44.
454. Lorenz M., Popp D., Holmes K.C. // *J. Mol. Biol.* 1993. Vol. 234. P. 826–836.
455. Попов Е.М. Структурная организация белков. М.: Наука, 1992.
456. Brunger A.T., Kuriyan M., Karplus M. // *Science.* 1987. Vol. 235. P. 458–460.
457. Holmes K.C., Tirion M., Popp D. et al. // *Adv. Exp. Biol. and Med.* 1993. Vol. 332. P. 15–22.
458. Milligan R.A., Whittaker M., Safer D. // *Nature.* 1990. Vol. 348. P. 217–221.
459. Lowey S., Slayter H.S., Weeds A.G. et al. // *J. Mol. Biol.* 1969. Vol. 42. P. 1–6.
460. Weeds A.G., Lowey S. // *Ibid.* 1971. Vol. 61. P. 701–708.
461. Margossian S.S., Stafford W.F., Lowey S. // *Biochemistry.* 1981. Vol. 20. P. 2151–2154.
462. Huxley H.E. // *J. Mol. Biol.* 1963. Vol. 7. P. 281–290.
463. Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж. и др. Молекулярная биология клетки. М.: Мир, 1987. Т. 3.
464. Muller H., Perry S.V. // *Biochem. J.* 1962. Vol. 85. P. 431–439.
465. Wagner P.D., Giniger E. // *Nature.* 1981. Vol. 292. P. 560–562.
466. Citi S., Kendrick-Jones J. // *BioEssays.* 1987. Vol. 7. P. 155–164.
467. Sellers J.S. // *Curr. Opin. Cell Biol.* 1991. Vol. 1. P. 98–105.
468. Elliott A., Offer G. // *J. Mol. Biol.* 1978. Vol. 123. P. 505–511.
469. Winkelmann D.A., Mekeel H., Rayment I. // *Ibid.* 1985. Vol. 181. P. 487–495.
470. Winkelmann D.A., Baker T.S., Rayment I. // *J. Cell Biol.* 1991. Vol. 114. P. 701–706.
471. Rayment I., Holden H.M. // *TIBS.* 1994. Vol. 19. P. 129–134.
472. Rayment I., Rypniewski W.R., Schmidt-Base K. et al. // *Science.* 1993. Vol. 261. P. 50–58.
473. White H.W., Rayment I. // *Biochemistry.* 1993. Vol. 33. P. 9859–9865.
474. Rayment I., Holden H.M., Whittaker M. et al. // *Science.* 1993. Vol. 261. P. 58–65.
475. Flicker F.F., Wallimann T., Vibert P. // *J. Mol. Biol.* 1983. Vol. 169. P. 723–741.
476. Yount R.G., Cremo C.R., Grammer J.C. et al. // *Philos. Trans. Roy. Soc. London. B.* 1992. Vol. 336. P. 55–61.
477. Pai E.F., Krengel V., Petsko G.A. et al. // *EMBO. J.* 1990. Vol. 9. P. 2351–2359.
478. Muller C.W., Schulz G.E. // *J. Mol. Biol.* 1992. Vol. 224. P. 159–177.
479. Lynn R.W., Taylor E.W. // *Biochemistry.* 1971. Vol. 10. P. 4617–4624.
480. Geeves M.A. // *Biochem. J.* 1991. Vol. 274. P. 1–14.
481. Taylor E.W. // *CRC Crit. Rev. Biochem.* 1979. Vol. 6. P. 103–164.
482. Hibberd M.G., Trentham D.R. // *Annu. Rev. Biophys. and Biochem.* 1986. Vol. 15. P. 119–161.
483. Wakabayashi K., Tokunaga M., Kohno I. // *Science.* 1992. Vol. 258. P. 443–447.
484. Taylor K.A., Amos L.A. // *J. Mol. Biol.* 1981. Vol. 147. P. 297–324.
485. Spudich J.A. // *Nature.* 1994. Vol. 372. P. 515–518.
486. Ruppel K.M., Uyeda T.Q.P., Spudich J.A. // *J. Biol. Chem.* 1994. Vol. 269. P. 18773–18780.
487. Finer J.T., Simmons R.M., Spudich J.A. // *Nature.* 1994. Vol. 368. P. 113–119.
488. Parratt L.G. // *Rev.Sci. Instrum.* 1959. Vol. 30. P. 297–320.
489. Goodwin R.P. // *Springer Tracts Modern Phys.* 1969. Vol. 51. P. 1–52.
490. Rosenbaum G., Holmes K.C., Witz J. // *Nature.* 1971. Vol. 230. P. 434–437.
491. Barrington L.J., Rosenbaum G. // *J. Appl. Crystallogr.* 1974. Vol. 7. P. 117–121.
492. Макульская Т.Д., Макульский М.А., Никитин А.А. и др. // *Докл. АН СССР.* 1974. Т. 218. С. 824–827.
493. Wyckoff H.W. // *Research applications of synchrotron radiation* / Ed. R.W. Watson, M.L. Perlman. Upton (N.Y.), 1973. P. 133–138. (Publ. Brookhaven Nat. Lab.; 5038).
494. Harrison S.C. // *Ibid.* P. 105–108.
495. Phillips J.C., Wlodawer A., Yevitz M.M., Hodgson K.O. // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1976. Vol. 73. P. 128–132.
496. Watowich S.J., Skehel J.J., Wiley D.C. // *Structure.* 1994. Vol. 2. P. 719–731.
497. Schneider T.R., Wilson K.S. // *Amer. Crystallogr. Assoc. Annu. Meet.* 1994. Vol. 22. P. 52.
498. Fulop Y., Phizackerley R.P., Soltis S.M. et al. // *Structure.* 1994. Vol. 2. P. 201–208.
499. Nikkola M., Lindqvist Y., Schneider G. // *J. Mol. Biol.* 1994. Vol. 238. P. 387–404.
500. Singer P.T., Smalas A., Carty R.P. et al. // *Science.* 1993. Vol. 259. P. 669–673.

501. Jacobson R.H., Zhang X.-J., Du Rose R.F. et al. // *Nature*. 1994. Vol. 369. P. 761—766.
502. John J., Crennell S.J., Hough D.W. et al. // *Structure*. 1994. Vol. 2. P. 385—393.
503. Dealwis C.G., Frazao C., Badasso M. // *J. Mol. Biol.* 1994. Vol. 236. P. 342—360.
504. Verschueren K.H.G., Seljee F., Rozeboom H.J. et al. // *Nature*. 1993. Vol. 363. P. 693—698.
505. Ullsch M.H., Somers W., Kossiakoff A.A., de Vos A.M. // *J. Mol. Biol.* 1994. Vol. 236. P. 286—299.
506. Lauble H., Kennedy M.C., Beinert H., Stout C.D. // *Ibid.* Vol. 237. P. 437—451.
507. Muller Y.A., Schumacher G., Rudolph R. et al. // *Ibid.* P. 315—335.
508. Teeter M.M., Roc S.M., Heo N.H. // *Ibid.* 1993. Vol. 230. P. 292—311.
509. Housset D., Habersetzer-Rochat C., Aster J.-P. et al. // *Ibid.* 1994. Vol. 237. P. 88—103.
510. Ahmed F.R., Rose D.R., Evans S.V. et al. // *Ibid.* 1993. Vol. 230. P. 1216—1224.
511. Schulze-Gahmen U., Rini J.M., Wilson J.A. // *Ibid.* Vol. 234. P. 1098—1118.
512. Ramakrishnan V., Finch J.T., Graziano V. et al. // *Nature*. 1993. Vol. 362. P. 219—223.
513. Newman M., Strzelecka T., Dorner L.F. et al. // *Structure*. 1994. Vol. 2. P. 439—452.
514. Wu H., Lustbader J.W., Lin Y., Hendrickson W.A. // *Ibid.* P. 545—558.
515. Smith J.L., Zaluzec E.J., Wery J.-P. et al. // *Science*. 1994. Vol. 264. P. 1427—1433.
516. Boyington J.C., Gaffney B.J., Amzel L.M. // *Ibid.* 1993. Vol. 260. P. 1482—1486.
517. Kuhlbrandt W. // *Quart. Rev. Biophys.* 1988. Vol. 21. P. 429—445.
518. Deisenhofer J., Epp O., Miki K. et al. // *Nature*. 1985. Vol. 318. P. 618—621.
519. Weiss M.S., Abele V., Weckesser J. et al. // *Science*. 1991. Vol. 254. P. 1627—1634.
520. Schafmeister Ch.E., Miercke L.J.W., Stroud R.M. // *Ibid.* 1993. Vol. 262. P. 734—738.
521. Thomas J.M. // *Nature*. 1993. Vol. 364. P. 478—482.
522. Franken S.M., Rozeboom H.J., Kalk K.H., Bijkstra B.W. // *EMBO J.* 1991. Vol. 10. P. 1297—1302.
523. Дженкс В. Катализ в химии и энзимологии. М.: Мир, 1972.
524. Ферит Э. Структура и механизм действия ферментов. М.: Мир, 1980.
525. Антонов В.К. Химия протеолиза. М.: Наука, 1991.
526. Stroud R.M., Ray L.M., Dickerson R.E. // *J. Mol. Biol.* 1974. Vol. 83. P. 185—208.
527. Chambers J.L., Stroud R.M. // *Acta crystallogr. B*. 1977. Vol. 33. P. 1824—1837.
528. Chambers J.L., Stroud R.M. // *Ibid.* 1979. Vol. 35. P. 1861—1869.
529. Huber R., Bode W. // *Accounts Chem. Res.* 1978. Vol. 11. P. 114—121.
530. Fehllhammer H., Bode W. // *J. Mol. Biol.* 1975. Vol. 98. P. 683—692.
531. Bode W., Schwager P. // *Ibid.* P. 693—717.
532. Ruhlmann A., Kukla D., Schwager P.A., Blow D.M. // *J. Mol. Biol.* 1973. Vol. 77. P. 417—436.
533. Huber R., Kukla D., Bode W. et al. // *Ibid.* 1974. Vol. 89. P. 73—101.
534. Sweet R.M., Wright H.T., Jonin J. et al. // *Biochemistry*. 1974. Vol. 13. P. 4212—4228.
535. Krieger M., Kay L.M., Stroud R.M. // *J. Mol. Biol.*, 1974. Vol. 83. P. 209—230.
536. Lang G., Spartalian K., Yonetani T. // *Biochim. et biophys. acta*. 1976. Vol. 451. P. 250—258.
537. Chance M., Powers L., Poulos T.L., Chance B. // *Biochemistry*. 1986. Vol. 25. P. 1266—1270.
538. Edwards S.L., Xuong N.H., Hamlin R.C., Krant J. // *Ibid.* 1987. Vol. 26. P. 1503—1511.
539. Pelletier H., Kraut J. // *Science*. 1992. Vol. 258. P. 1748—1755.
540. Schlichting I., Berendzen J., Phillips G.N., Sweet R.M. // *Nature*. 1994. Vol. 371. P. 808—812.
541. Teng T.-Y., Srajer V., Moffat K. // *Nature Struct. Biol.* 1994. Vol. 1. P. 701—705.
542. Petsko G.A. // *Nature*. 1994. Vol. 371. P. 740—741.
543. Phillips G.N. // *Biophys. J.* 1990. Vol. 57. P. 381—383.
544. Dasgupta S., Spiro T.G. // *Biochemistry*. 1986. Vol. 25. P. 5941—5948.
545. Chance M., Parkhurst J.L., Woolery G.L., Chance B. // *J. Biol. Chem.* 1986. Vol. 261. P. 5689—5692.
546. Gibson Q.H., Regan R., Elber R. et al. // *Ibid.* 1992. Vol. 268. P. 17908—17916.
547. Ruszera K., Lambry J.C., Martin J.-L., Karplus M. // *Proc. Nat. Acad. Sci. US*. 1993. Vol. 90. P. 5805—5807.
548. McRee D.E. *Practical protein crystallography*. N.Y.: Acad. press, 1993.

549. Green D.W., Ingram V.M., Perutz M.F. // Proc. Roy. Soc. London A. 1954. Vol. 225. P. 287—300.
550. Honl H. // Ztschr Phys. 1933. Bd. 84. S. 1—15.
551. Karle J. // Intern J. Quant. Chem. Symp. 1980. Vol. 7. P. 357—367.
552. Hendrickson W.A. // Trans. Amer. Crystallogr. Assoc. 1985. Vol. 21. P. 11—21.
553. Hendrickson W.A., Teeter M.M. // Nature. 1981. Vol. 290. P. 107—113.
554. Kahn R., Fourme R., Bosshard R. et al. // FEBS Lett. 1985. Vol. 179. P. 133—137.
555. Hendrickson W.A. // Acta crystallogr. A. 1984. Vol. A40:C—3.
556. Smith J.L., Pahler A., Murthy H.M.K., Hendrickson W.A. // Ibid. 1987. Vol. A43:C—10.
557. Hendrickson W.A., Troup J.M., Swepston P.N., Zdansky G. // Abstr. Amer. Crystallogr. Assoc. Ser. 2. 1986. Vol. 14. P. 48.
558. Hendrickson W.A., Smith J.L., Phizackerley R.P., Meritt E.A. // Proteins. 1988. Vol. 4. P. 77—88.
559. Hendrickson W.A., Horton J.R., Le Master D.M. // EMBO J. 1990. Vol. 9. P. 1665—1672.
560. Cowie D.B., Cohen G.N. // Biochim. et biophys. acta. 1957. Vol. 26. P. 252—261.
561. Le Master D.M. // J. Virol. 1986. Vol. 59. P. 759—760.
562. Hendrickson W.A. // Science. 1991. Vol. 254. P. 51—58.
563. Otwinowski Z. // Isomorphous replacement and anomalous scattering / Ed. W. Wolf et al. Daresbury, 1991. P. 80—86.
564. Bricogne G. // Ibid. P. 60—68.
565. Newman M., Strzelecka T., Dorner L.F. et al. // Structure. 1994. Vol. 2. P. 439—452.
566. Wu Hao, Lustbader J.W., Lin Yee et al. // Structure. 1994. Vol. 2. P. 545—558.
567. Smith J.L., Zaluzec E.J., Wery J.-P. et al. // Science. 1994. Vol. 264. P. 1427—1433.
568. Hvidt A., Linderstrom-Lang K. // Biochim. et biophys. acta. 1954. Vol. 14. P. 574—581.
569. Schoenborn B.P. // Cold. Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1971. Vol. 36. P. 569—575.
570. Schoenborn B.P. Structure and function of oxidation reduction enzymes / Ed. A. Akesson, A. Ehreberg. Oxford: Pergamon press, 1972. P. 109—116.
571. Hanson J.C., Schoenborn B.P. // J. Mol. Biol. 1981. Vol. 153. P. 117—130.
572. Kossiakoff A.A. // Nature. 1982. Vol. 296. P. 713—716.
573. Kossiakoff A.A. // Brookhaven Symp. Biol. 1982. Vol. 32. P. 161—170.
574. Schoenborn B.P., Hanson J.C. // Water in polymers. Wash. (D.C.); Amer. Chem. Soc. 1980. P. 215—224. (ACS Symp.; 127).
575. Takano T. // J. Mol. Biol. 1977. Vol. 110. P. 537—551.
576. Chui W. // Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 1993. Vol. 22. P. 233—255.
577. DeRosier D.J., Klug A. // Nature. 1968. Vol. 217. P. 130—134.
578. De Rosier D.J., Moore P.B. // J. Mol. Biol. 1970. Vol. 52. P. 355—369.
579. Crowtyer D.J., Amos L.A., Finch J.T. et al. // Nature. 1970. Vol. 226. P. 421—425.
580. Amos L.A., Henderson R., Unwin P.N.T. // Progr. Biophys. and Mol. Biol. 1982. Vol. 39. P. 181—231.
581. Kuhlbrandt W. // Quart. Rev. Biophys. 1992. Vol. 1. P. 1—49.
582. Джанджузян К.Н., Модянов Н.Н., Овчинников Ю.А. // Биооргани. химия. 1981. Т. 7. С. 847—857.
583. Skriver E., Maunsbach A.B., Jorgensen P.L. // FEBS Lett. 1981. Vol. 131. P. 219—222.
584. Демин В.В., Барнаков А.Н., Лунев А.В. и др. // Биол. мембраны. 1984. Т. 1. С. 831—837.
585. Овчинников Ю.А., Демин В.В., Барнаков А.Н. и др. // Там же. 1986. Т. 3. С. 537—541.
586. Dratz E.A., Van Breemen J.F.L., Kamps K.M.P. et al. // Biochim. et biophys. acta. 1985. Vol. 832. P. 337—342.
587. Demin V.V., Yurkova E.V., Kuzin A.P. et al. // Proc. of the Intern conf. on retinal proteins, Irkutsk (Lake Baikal), USSR, 22—28 July, 1986. Utrecht: VNU Science press, 1986.
588. Hovmöller S., Slaughter M., Berriman J. et al. // J. Mol. Biol. 1983. Vol. 165. P. 401—406.
589. Newman R.H. // Electron Microsc. Rev. 1991. Vol. 4. P. 197—203.
590. Дубачев Г.Э., Лунев А.В., Барнаков А.Н. и др. // Биол. мембраны, 1993. Т. 10. С. 409—419.
591. Dubachev G.E., Lunev A.V., Barnakov A.N. et al. // Biol. Membr. 1994. Vol. 7. P. 391.

592. Laird D.M., Eble K.S., Cunningham C.C. // J. Biol. Chem. 1986. Vol. 261. P. 14844—14855.
593. Bianchet C., Ysern X., Hullihen J. et al. // Ibid. 1991. Vol. 266. P. 21197—21201.
594. Hjelmeland L.M., Chrambach A. // Meth. Enzymol. 1984. Vol. 104. P. 305.
595. Досон Р., Эллуот Д., Эллуот У., Джонс К. // Справочник биохимика. М.: Мир., 1991. С. 236—237.
596. Dubachev G.E., Lunev A.V., Barnakov A.N. et al. // FEBS Lett. 1993. Vol. 336. P. 181—183.
597. Abrahams J.P., Lutter R., Todd R.J. et al. // EMBO J. 1993. Vol. 12. P. 1755—1780.
598. Ovchinnikov Yu.A., Abdulaev N.G., Zolotarev A.S. et al. // FEBS Lett. 1988. Vol. 231. P. 237—242.
599. Ovchinnikov Yu.A., Abdulaev N.G., Shmukler B.E. et al. // Ibid. P. 364—368.
600. Yurkova E.V., Tsygannik I.N., Zargarov A.G. et al. // Ibid. 1989. Vol. 256. P. 167—169.
601. Deisenhofer J., Epp O., Miki K. et al. // Biology 1984. Vol. 180. P. 385—398.
602. Yeates T.O., Komiya H., Rees D.S. et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1987. Vol. 84. P. 6438—6442.
603. Allen J.P., Feher J., Yeates T.O. et al. // Ibid. P. 6162—6166.
604. Karlson B., Hovmoller S., Weiss H., Leonard K. // J. Mol. Biol. 1983. Vol. 165. P. 287—302.
605. Volkova T.M., Avetisyan N.A., Kudelin A.B., Grishin E.V. // J. Cell Biochem. 1990. Suppl. 14F. P. 45.
606. Барнаков А.Н., Лунев А.В., Демин В.В. и др. // Биол. мембраны. 1991. Т. 8. С. 1248—1253.
607. Гришин Е.В., Коваленко В.А., Пашков В.Н. Шамотиенко А.Г. // Там же. 1984. Т. 1. С. 858—867.
608. Лунев А.В., Демин В.В., Зайцев О.И. и др. // Биоорган. химия. 1991. Т. 17. С. 1021—1026.
609. Ovchinnikov Yu.A., Demin V.V., Barnakov A.N. et al. // FEBS. Lett. 1985. Vol. 190. P. 73—76.
610. Henderson R., Unwin P.N.T. // Nature. 1975. Vol. 257. P. 28—32.
611. Овчинников Ю.А., Арсенян С.Г., Броуде Н.Е. и др. // Докл. АН СССР. 1985. Т. 285. С. 1490—1496.
612. Овчинников Ю.А., Броуде Н.Е., Петрухин К.Е. и др. // Там же. 1986. Т. 287. С. 1491—1496.
613. Dzhandzhugasyan K.N., Jorgensen P.L. // Biochim. et biophys. acta. 1985. Vol. 817. P. 165—175.
614. Jorgensen P.L., Brunnt J. // Ibid. 1983. Vol. 735. P. 291—296.
615. Deatherage J.F., Henderson R., Capaldi R.A. // J. Mol. Biol. 1982. Vol. 158. P. 487—499.
616. Henderson R., Baldwin J.V., Cesrf T.A. et al. // Ibid. 1990. Vol. 213. P. 899—929.
617. Овчинников Ю.А., Демин В.В., Гришин Е.В., Снадар С.Н. // Биол. мембраны. 1985. Т. 2. С. 957—961.
618. Демин В.В. // Там же. 1988. Т. 5. С. 116—134.
619. Zingsheim H.L., Neigebauer D.Ch., Frank G. et al. // EMBO J. 1982. Vol. 1. P. 541—547.
620. Kistler J., Straud R.M., Klymkowsky M.W. et al. // Biophys. J. 1982. Vol. 37. P. 371—383.
621. Bisson A., Unwin P.N.T. / Nature. 1985. Vol. 315. P. 474—478.
622. Демин В.В., Лунев А.В., Зайцева Ф.Б. // Биол. мембраны. 1989. Т. 6. С. 801—813.
623. Wahrman S.P., Gros F., Schapira G. // Biochim. et biophys. acta. 1980. Vol. 612. P. 421—423.
624. Демин В.В. // Физико-химические методы исследования структуры биополимеров и низкомолекулярных биорегуляторов. М.: Наука, 1992. С. 284—329.

Часть II

ЭМПИРИЧЕСКИЙ ПОДХОД К ПРЕДСКАЗАНИЮ ПРОСТРАНСТВЕННОГО СТРОЕНИЯ БЕЛКОВ

Определение аминокислотных последовательностей и расшифровка трехмерных структур миоглобина, гемоглобина, лизоцима и ряда других белков позволили в 1960-е годы сформулировать задачу установления зависимости между химическим и пространственным строением белковых молекул. Впервые стала возможной постановка исследований структурной организации белков, конечная цель которых заключается в априорном предсказании нативной конформации и динамических свойств белковых молекул по известной аминокислотной последовательности. Поиски решения этой задачи продолжаются с возрастающей интенсивностью более тридцати лет. С самого начала возобладавал и по сей день остается господствующим, чуть ли не единственным, эмпирический подход. Его материальной основой служат главным образом данные рентгеноструктурного анализа белков, а идейной — три гипотетических представления: α -спиральная концепция Полинга и Кори [1, 2], классификация белковых структур на первичную, вторичную и третичную, предложенная Линдерстрем-Лангом [3], и гидрофобная концепция Козмана [4].

Согласно первой концепции пространственная структура белковой молекулы (третичная) представляет собой ансамбль регулярных (вторичных) структур, образуемых основной цепью. Данные о конформационных состояниях синтетических полипептидов, фибриллярных белков и впервые ставшие известными на атомном уровне трехмерные структуры миоглобина и гемоглобина дали блестящие и как будто бы бесспорные доказательства справедливости предположения, высказанного еще Астбери и остававшегося в молекулярной биологии безальтернативным в течение десятилетий, о единстве структурных элементов белковых молекул. Кристаллографические структуры миоглобина и гемоглобина явились подлинным триумфом α -спиральной концепции Полинга и Кори, которая после этого представлялась уже не как весьма правдоподобная и полезная рабочая гипотеза, а как не вызывающий сомнений принцип пространственной организации белковых молекул. Эта концепция легла в основу структурной классификации белков Линдерстрем-Ланга и стала направляющей идеей поиска эмпирических правил свертывания полипептидной цепи. Ей не только не противоречила, а, напротив, на первый взгляд, естественным образом дополняла концепция гидрофобных взаимодействий Козмана. Последняя ут-

верждает, что аминокислотная последовательность, образованная из α -спиралей, β -структур и унифицированных по форме основной цепи изгибов, сворачивается в глобулу, состоящую из неполярного, гидрофобного ядра и полярной, гидрофильной оболочки.

Глава 7

ФАКТОРЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ СТАБИЛЬНОСТЬ ТРЕХМЕРНОЙ СТРУКТУРЫ БЕЛКА

Установление аминокислотных последовательностей и расшифровка на атомном уровне пространственных структур белков вызвали повышенный интерес к изучению свертывания белковой цепи в нативную конформацию и природы сил, ее стабилизирующих. Знание химического и пространственного строения создало новые, более благоприятные условия для выяснения принципов пространственной организации белковых молекул. Наличие количественных характеристик реальной структуры белка сделало возможным перейти от общих рассуждений на эту тему и феноменологических описаний к конкретному изучению процесса формообразования и разработке соответствующих физических моделей. Исходную теоретическую основу такого моделирования могли бы составить ответы на следующие вопросы, имеющие самый общий характер и, следовательно, касающиеся всех белков.

1. Каково соотношение между химическим и пространственным строением белковой молекулы?

2. Каким образом происходит формирование пространственной структуры белка; осуществляется ли свертывание белковой цепи в физиологически активную форму спонтанно или существует специальный морфогенетический механизм, действующий в процессе или после завершения матричного синтеза белка на рибосоме?

3. Какую роль играют термодинамические и кинетические факторы в пространственной организации белка; обладает ли трехмерная структура белковой молекулы в нативных условиях минимальной свободной энергией Гиббса или она отвечает термодинамически метастабильному состоянию?

Ответы на эти вопросы в гипотетической форме были предложены впервые в 1954 г. Р. Ламри и Г. Эйрингом [5]. Авторы исходили из представления о трехмерной структуре белка, состоящей из взаимодействующих между собой регулярных участков. Такая упрощенная модель следовала из предложенного Линдерстрем-Лангом разделения белковой структуры на первичную, вторичную и третичную [3]. Главным стабилизирующим фактором, в согласии с концепцией А. Мирского и Л. Полинга, сформулированной в 1936 г., принимались водородные связи, скрепляющие вторичные структуры [6]. Последние образуют

жесткую третичную структуру посредством главным образом ион-дипольных и ван-дер-ваальсовых взаимодействий боковых цепей аминокислотных остатков. Свои представления Ламри и Эйринг обосновывали имеющимися данными о денатурации белков. Явление денатурации определено ими как изменение конформации белковой молекулы. Полностью обратимые денатурационные процессы они связали с нарушением только третичной структуры, т.е. с разрушением связей между вторичными структурами, а необратимые процессы – с более глубокими конформационными изменениями, затрагивающими вторичные структуры. На основе отмеченной выше структурной модели белка и качественного рассмотрения денатурации Ламри и Эйринг постулируют следующие положения [5]: во-первых, аминокислотная последовательность однозначно определяет нативную, физиологически активную конформацию белка; во-вторых, свертывание белковой цепи в жесткую нативную конформацию осуществляется спонтанно, т.е. имеется прямая связь, не требующая посредников, между линейным порядком аминокислот и их расположением в пространстве; в-третьих, стабильная в физиологических условиях конформация белка отвечает минимальной свободной энергии Гиббса.

Ни один из ставших известными с тех пор экспериментальных фактов не вступил в противоречие с постулатами Ламри и Эйринга.

Специфическим свойством эволюционно отобранной аминокислотной последовательности является способность принимать в физиологических условиях вполне определенную, уникальную конформацию, которая определяет биологическую функцию белка. Такой способностью белки обладают, несмотря на значительную конформационную свободу аминокислотных остатков и малые значения барьеров вращения вокруг ординарных связей основной и боковых цепей. Плотная, глобулярная структура белковой молекулы непосредственно доказывалась малой вязкостью белков в растворе и большей их плотностью по сравнению с синтетическими полипептидами. Молекулы последних образуют в тех же условиях рыхлые клубки с открытой структурой, в которых растворитель занимает до 99% всего объема. Отсюда сравнительно большие линейные размеры клубков и значительная вязкость белков в этом состоянии. Молекулы нативных белков содержат в несколько раз меньшее количество связанной воды (~30% по массе), они малы по линейным размерам и незначительно загущают раствор. На это указывает вся совокупность результатов исследования белка и синтетических полипептидов методами седиментации, диффузии, светорассеяния, рентгеноструктурного анализа, нейтронографии, рассеяния рентгеновских лучей под малыми углами, электронной микроскопии.

Какие же факторы определяют плотную упаковку полипептидной белковой цепи, т.е. стабильность трехмерной структуры? Это одна из центральных проблем пространственной организации молекул белка. В данной главе она будет рассмотрена с той полнотой, которая отвечает состоянию структурных исследований белков в период 1950–1960-х годов. В следующем томе после анализа нового экспериментального и

теоретического материала обсуждение этой проблемы будет продолжено.

Из общих соображений следует, что трехмерная структура белка обусловлена не сильными химическими, а слабыми невалентными взаимодействиями атомов звеньев полипептидной цепи. Единственными ковалентными связями в белковой глобуле между далеко отстоящими участками цепи являются дисульфидные связи между остатками цистеина. Наличие нескольких дисульфидных "сшивок", конечно, накладывает заметные ограничения на конформационную свободу белка. Однако нельзя сказать, что S-S-мостики определяют плотную упаковку молекулы. Далеко не все белки содержат остатки цистеина. Дисульфидные связи отсутствуют, например, в последовательностях миоглобина, гемоглобина, белка вируса табачной мозаики, нуклеазы стафилококка. Между тем эти белки имеют четко фиксированную глобулярную форму и не отличаются меньшей плотностью.

С другой стороны, каучук, вулканизированный серой, сохраняет свойства статистического клубка, несмотря на наличие ди- и полисulfидных мостиков. Изучение обратимой денатурации белков с разрывом и последующим спонтанным восстановлением первоначальных дисульфидных связей, прежде всего исследование К. Анфинсена [7] денатурации и ренатурации рибонуклеазы А, склоняет к предположению, что не S-S-мостики создают нативную структуру, а, напротив, структура, формирующаяся за счет слабых взаимодействий, приводит к сближению вполне определенных остатки цистеина и тем самым обуславливает избирательное образование системы дисульфидных связей. Таким образом, можно заключить, что белковую глобулу создают слабые невалентные взаимодействия. Невалентные взаимодействия в водорастворимом белке могут возникать между пептидными группами основной цепи, между боковыми цепями аминокислотных остатков, между звеньями основной цепи и боковыми цепями. Кроме того, поскольку белок сохраняет свою нативную конформацию и функционирует только в водном растворе при определенных, так называемых физиологических значениях pH и ионной силы, то структура определяется также взаимодействиями белка с молекулами воды и находящимися в ней соединениями и ионами. Окружающая среда, помимо этого, оказывает конкурирующее и иное влияние на внутримолекулярные взаимодействия. Рассмотрим сложившееся мнение о природе перечисленных взаимодействий, об их вкладах в конформационную энергию и, следовательно, влиянии на стабильность пространственной структуры белковой молекулы.

7.1. ВОДОРОДНАЯ СВЯЗЬ

Давно утвердилось представление о том, что главной силой, формирующей структуру белка, является водородная связь между пептидными группами основной цепи. Еще Астбери в 1933 г. предполагал, что α -кератин имеет форму вытянутых цепей, удерживаемых вместе водородными связями [8]. А. Мирский и Л. Полинг были первыми, кто в

1936 г. постулировал доминирующее влияние этих связей на структуру белка [6]. В 1940 г. Полинг писал: "Из сил, участвующих в сохранении нативной конформации белка, водородные связи являются, вероятно, наиболее важными" [9. С. 2656].

В первых моделях пространственного строения белковых молекул водородная связь служила главным стабилизирующим фактором. Молекулы фибриллярных белков представлялись слоистыми структурами, а молекулы глобулярных белков – пакетом слоистых структур, состоящих или из плоских пептидных цепей, скрепленных водородными связями, или из свернутых, регулярных цепей, также стабилизированных внутренними водородными связями. Отклонение от регулярности, повороты цепей и нарушение оптимальных условий образования внутримолекулярных водородных связей допускались лишь в местах аминокислотной последовательности, где находятся остатки пролина. Среди тех, кто считал водородную связь не только главной, но и единственной упаковочной силой, был М. Хаггинс [10, 11]. Все предложенные им структуры полипептидов были полностью насыщены водородными связями. Этот же принцип был положен в основу конструирования пептидных моделей Л. Брэггом, Дж. Кендрию и М. Перутцем [12], а также α -спирали и β -структуры складчатых листов Л. Полингом и Р. Кори [1, 2].

Представление об исключительной роли водородных связей неизбежно следует из имеющегося в то время экспериментального материала, который свидетельствовал о структурном единстве фибриллярных и глобулярных белков и синтетических полипептидов. Как в твердом состоянии, так и в растворе пептидные цепи тех и других белков наблюдались в однотипных спиральных или β -структурных конформациях, т.е. в таких формах, которые только и могли обеспечить полную насыщенность водородными связями между пептидными группами. Следовательно, в силу взаимообусловленности концепций спиральности и водородного связывания утверждение, что наиболее стабильные полипептидные структуры регулярны, эквивалентно утверждению: полипептидные структуры содержат 100%-ное количество пептидных водородных связей. Среди всех видов слабых невалентных взаимодействий атомов водородная связь максимально понижает энергию системы. Л. Полинг и Р. Кори оценивали энергию пептидной водородной связи $N-H...O=C$ $-8,0$ ккал/моль. Заметим, что эта величина по крайней мере в два раза выше ее реального значения. В связи с чем вполне оправданно выглядит предположение, что водородная связь вносит вклад в стабилизацию регулярных структур полипептидного остова или, иными словами, является тем фактором, который диктует способ укладки полипептидной цепи. Так как водородная связь обладает направленностью и проявляется в узком интервале расстояний между группами NH и CO около $1,8 \text{ \AA}$, то, очевидно, наиболее предпочтительными должны быть те регулярные конформации, которые обеспечивают для образования водородных связей между всеми пептидными группами оптимальные условия. Именно такими конформациями оказались α -спираль и β -структура складчатых листов,

предсказанные Полингом и Кори и обнаруженные у синтетических полипептидов и фибриллярных и глобулярных белков.

Квантовомеханическая теория водородной связи, развитая в 1957 г. К. Коулсоном [13] и Н.Д. Соколовым [14], основана на представлении о ее донорно-акцепторной природе, обусловленной обобществлением неподеленной пары электронов. В системе А–Н...В связь А–Н находится в промежуточном между ионным (A^--H^+) и ковалентным состояниями. Вследствие уменьшения электронной плотности вблизи атома Н уменьшается и отталкивание между водородом и атомом В. Кроме того, появляется дополнительное притяжение между Н и В, вызванное перераспределением электронной плотности у атома В в поле атома Н и участием электронов неподеленной пары в качестве связывающих. Н.Д. Соколовым получено количественное истолкование спектроскопических проявлений водородной связи: значительное смещение частоты валентного колебания А–Н в длинноволновую область и резкое увеличение интенсивности инфракрасной полосы поглощения этого колебания. Было также показано, что первой стадией процесса межмолекулярного или внутримолекулярного перехода протона всегда является образование водородной связи. Водородная связь формирует структуру воды и определяет многие ее свойства.

Количественная оценка энергии водородной связи на основе квантовой механики пока еще сложна и мало надежна, поэтому используют эмпирический подход. Впервые потенциальную функцию водородной связи предложили Е. Липпинкотт и Р. Шредер [15, 16]. Функция очень громоздка, содержит много параметров, трудноопределяемых из экспериментальных данных и не имеющих ясного физического смысла. Потенциал Липпинкотта и Шредера непригоден для описания водородной связи в различных средах.

У. Маултон и соавт. модифицировали функцию, введя в нее угловую зависимость энергии водородной связи от ее направленности [17]. В таком варианте потенциал Липпинкотта и Шредера был использован Г. Шерагой и соавт. при исследовании пространственной структуры полипептидов [18, 19]. Следующая попытка описать водородную связь принадлежит А. Ликвори и соавт. [20], которые приняли электростатическую модель связи и использовали зависимость У. Штокмаера [21], описывающую взаимодействия полярных молекул. Д. Поландом и Г. Шерагой предложена функция водородного связывания, содержащая один член в форме потенциала Леннарда–Джонса, а другой – в кулоновской форме [22]. В работе Е.М. Попова и соавт. [23] водородная связь рассматривалась как донорно-акцепторное взаимодействие и была аппроксимирована потенциальной функцией в форме потенциала П. Морзе [24]. Из трех параметров этой функции два определяются непосредственно из опыта, к ним относится энергия диссоциации водородной связи и равновесная длина. Третий эмпирический параметр подбирается.

Многочисленные исследования фибриллярных белков и полипептидов показали, что при изменении внешних условий α -спираль может относительно легко переходить в β -структуру. Так как обе конформации

насыщены водородными связями, переход $\alpha \rightleftharpoons \beta$ не противоречил представлению об исключительной роли водородной связи в стабилизации структуры полипептидов и белков. В рамках этой же концепции объяснялся и ряд других факторов. Так, разрушение α -спирали и β -структуры в растворах сильнополярных растворителей естественно было связать со значительным ослаблением в подобных средах пептидных водородных связей, а отсутствие α -спирали у поли-*L*-серина и *L*-треонина – с конкуренцией водородных связей в основной цепи $\text{N}-\text{H}\dots\text{O}=\text{C}$ и между группами основной и боковой цепей $\text{N}-\text{H}\dots\text{O}$, что, конечно, снижает стабильность α -спирали. В то же время в β -структуре полипептидов серина и треонина водородная связь между основной и боковой цепями может реализоваться одновременно с межцепочечной водородной связью и, следовательно, дополнительно стабилизировать эту конформацию. Водородная связь такого типа в α -спирали невозможна по стерическим причинам. Со временем, однако, стали известны многие факты, которые было трудно объяснить только с позиции концепции пептидной водородной связи. Так, гомополипептиды природных α -аминокислот в твердом состоянии и в растворе как полярных, так и неполярных растворителей находятся не только в регулярных формах, но и в виде аморфной части флуктуирующего клубка. Легкость перехода $\alpha \rightleftharpoons \beta \rightleftharpoons$ клубок в растворе указывает на близость значений свободной энергии у α - и β -форм и нерегулярной формы. Последняя представляет собой огромное множество рыхлых, практически лишенных пептидных водородных связей конформаций.

Эксперименты П. Доти, Э. Блоута и соавт. [25–28] с поли-*L*-лизинном и поли-*L*-глутаминовой кислотой в водной среде показали, что конформационное состояние пептидного скелета определяется не им самим, а далеко отстоящими от него концевыми группами боковых цепей. Оба полимера принимают форму α -спирали в областях рН, где боковые цепи незаряжены и находятся в форме клубка в нейтральной области рН. Содержание клубка у поли-*L*-лизина увеличивается с уменьшением рН, а у поли-*L*-глутаминовой кислоты – с увеличением рН. У некоторых гомополипептидов были обнаружены структуры, не отвечающие оптимальному водородному связыванию (спирали 3_{10} , 4_{13} , полиглицин).

Значимость пептидных водородных связей для поддержания регулярных конформаций в водной среде, где возможно образование конкурентных водородных связей групп $\text{C}=\text{O}$ и $\text{N}-\text{H}$ с молекулами растворителя, была поставлена под сомнение Козманом [4]. Экспериментальные данные Дж. Шеллмана [29], И. Клотца и Дж. Франзена [30, 31], действительно, показали, что энергия водородной связи $\text{N}-\text{H}\dots\text{O}=\text{C}$ в водном окружении незначительна (1,5–0 ккал/моль).

7.2. ВАН-ДЕР-ВААЛЬСОВЫ И ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

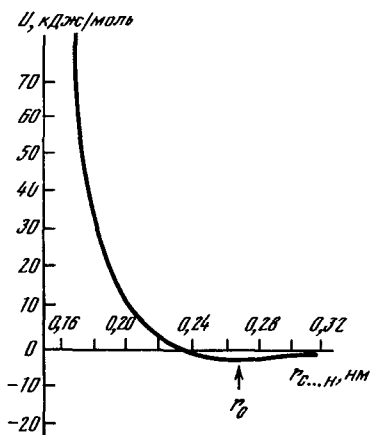
Для объяснения конформационной стабильности синтетических полипептидов и белков все больший акцент делается на влияние ван-дер-ваальсовых и электростатических взаимодействий боковых цепей друг с другом и с пептидным остовом. В связи с этим предпринимаются попытки связать наблюдаемую конформацию с аминокислотным составом и последовательностью. Ван-дер-ваальсовы взаимодействия имеют электрическую природу. Они обусловлены взаимодействием электронных оболочек атомов. На больших расстояниях между парой атомов действуют силы притяжения. Они получили название дисперсионных сил. Их теория была выработана Ф. Лондоном [32] в 1930 г. и Дж. Слетером и Дж. Кирквудом [33] в 1931 г. Дисперсионные, лондоновские, силы определяются взаимодействием "мгновенных" диполей двух атомов, возникающих вследствие квантовомеханического движения электронов; они пропорциональны $1/r^6$, где r – расстояние между атомами. При дальнейшем сближении атомов возникают силы отталкивания, которые на малых расстояниях становятся доминирующими. Отталкивание возникает из-за невозможности пространственного совмещения двух электронных систем. Силы отталкивания пропорциональны $1/r^{12}$ или e^{-cr} (c – эмпирическая константа).

Отрицательная, стабилизирующая энергия ван-дер-ваальсовых взаимодействий двух атомов невелика (0,1–0,3 ккал/моль), но при взаимодействии многоатомных групп на оптимальном расстоянии (r_0) она может достигать нескольких килокалорий на 1 моль и вносить существенный вклад в стабилизацию (рис. П.1). На малых расстояниях энергия резко возрастает и валентно несвязанные атомы не могут сближаться на расстояние, значительно меньшее r_0 . Такой характер зависимости позволяет сделать довольно грубое, но тем не менее полезное упрощение. Так как слева от r_0 кривая очень крутая, а отрицательная энергия в минимуме незначительна, то потенциал можно представить в виде угловой зависимости. В этом случае справа от вертикали атомы между собой вообще не взаимодействуют, а слева энергия бесконечна и соответствующие расстояния являются запрещенными. Такое представление потенциала отвечает модели жестких сферических атомов. Пока в такой молекулярной модели шары-атомы не касаются друг друга, они не взаимодействуют; в то же время они не могут сближаться на расстояние, меньшее суммы ван-дер-ваальсовых радиусов. Таким образом, широко распространенные атомные модели (проволочные Кендрию–Уотсона и Бирона, пластмассовые Николсона, объемные Кори–Полинга–Колтена) имеют определенное теоретическое обоснование. Из характера кривой $U(r)$ видна и условность всех моделей. Во-первых, в моделях в значительной мере произвольно выбираются ван-дер-ваальсовы радиусы атомов (реальное взаимодействие около r_0 мягкое); во-вторых, в них не учитываются дисперсионные силы притяжения; в-третьих, не принимаются во внимание другие виды

воздействий и, в-четвертых, с помощью моделей жестких сфер нельзя оценить энергию разрешенных конформаций. Тем не менее их использование чрезвычайно полезно при построении трехмерных структур белков по картам электронной плотности и для предсказания запрещенных конформаций.

Ван-дер-ваальсовы взаимодействия атомов не имеют специфической направленности, и их энергия в молекуле определяется в виде аддитивной суммы всех парных взаимодействий атомов. По некоторым ориентировочным оценкам, энергия ван-дер-ваальсовых взаимодействий в белках того же порядка, что и энергия водородных связей [34].

Учет электростатических взаимодействий в полипептидах и белках представляет наибольшие трудности из-за отсутствия соответствующей теории. Однако значительное влияние этих взаимодействий на конформацию очевидно, особенно в случае пептидов, состоящих из аминокислот, боковые цепи которых могут иметь целочисленный заряд (лизин, аргинин, аспарагиновая и глутаминовая кислоты). Для оценки электростатических взаимодействий используют классическое монопольное или дипольное приближение. Парциальные заряды на атомах пептидной группы и боковых цепей определяются или из дипольных моментов соответствующих простых молекул или путем квантовомеханических расчетов. Весьма условен выбор диэлектрической постоянной. На близких расстояниях эта величина не равна макроскопической диэлектрической проницаемости среды. Она зависит от поляризуемости взаимодействующих между собой атомов, влияния растворителя. Подробно эти вопросы будут рассмотрены в следующем томе.



Р и с. II.1. Потенциальная кривая невалентного взаимодействия $C \dots H$

7.3. ГИДРОФОБНЫЙ ЭФФЕКТ

Отмеченные виды взаимодействий являются чисто внутримолекулярными, касающимися взаимодействий между участками полипептидной цепи. Однако белки функционируют в воде, которая активно влияет на свертывание гибкой полипептидной цепи в глобулярную форму. Среди межмолекулярных взаимодействий фундаментальная роль в организации глобулы отводится так называемым гидрофобным взаимодействиям. Понятие о таких взаимодействиях возникло в начальный период изучения коллоидного состояния высокомолекулярных поверхностно-активных веществ, в том числе белков. Сам термин "гидро-

фобные взаимодействия" предложил И. Ленгмюр в 1916 г. при выводе уравнения изотермы мономолекулярной адсорбции для характеристики соединений и атомных групп, не смачивающихся водой ("частокол" Ленгмюра). Так как сильногидрофильные и сильногидрофобные коллоиды резко различаются по многим свойствам, разделение коллоидов по признаку смачиваемости и несмачиваемости водой было положено в основу классификации коллоидных систем.

Природа гидрофобности долгое время оставалась невыясненной. Впервые трактовка этого явления была дана в 1959 г. Козманом [4]. Им же применительно к белкам предложена концепция гидрофобных взаимодействий, согласно которой углеводородные боковые цепи аминокислотных остатков преимущественно контактируют друг с другом, а не с водой; полярные же боковые цепи, напротив, предпочтительно взаимодействуют с водой. В результате этих тенденций белковая цепь укладывается таким образом в компактную глобулу, чтобы неполярные остатки оказались во внутренней части молекулы и образовали бы там нечто вроде углеводородной капли, экранированной от воды, а полярные остатки расположились на поверхности, соприкасающейся с водой. У. Козман проанализировал термодинамику процесса перехода молекул углеводов из неполярной среды в водное окружение: чистый жидкий углеводород → углеводород в воде.

В табл. II.1 приведены значения изменений энтропии (ΔS), энтальпии (ΔH) и свободной энергии (ΔG), полученные для этого процесса Г. Франком и М. Эвансом [35] и У. Клоссеном [36, 37]. Из табл. II.1 видно, что у алифатических соединений переход неизменно сопровождается уменьшением энтальпии, т.е. является экзотермическим процессом, а у ароматических соединений он происходит практически без изменения энтальпии. Во всех случаях имеет место значительное уменьшение энтропии. Следовательно, низкое сродство углеводов к водному окружению обусловлено не неблагоприятной чисто энергетической ситуацией, а понижением энтропии. На энтропийный источник низкого сродства неполярных групп к воде обратили внимание еще в 1930-е годы. Он был привлечен для объяснения возникновения мицелл в водных коллоидных растворах мыл и моющих средств [35, 38–40]. В мицелле гидрофобные группы располагаются внутри, а гидрофильные — на ее поверхности. Большой энтропийный эффект наблюдается при растворении в воде многих органических молекул, содержащих неполярные группы, присоединенные к полярным. Как известно, растворение алифатических спиртов в воде сопровождается увеличением свободной энергии (положительное отклонение от закона Рауля); в то же время при избытке воды процесс экзотермичен. Это может быть только в случае уменьшения энтропии: $\Delta S = (\Delta H - \Delta G)/T < 0$. Растворимость многих алифатических производных в воде уменьшается с ростом температуры. Согласно принципу Ле Шателье, это означает, что при переходе молекул из слабополярной или неполярной среды в воду $\Delta H < 0$. Тот факт, что вещества не смешиваются с водой во всех пропорциях, означает, что $\Delta G > 0$ и, следовательно, $\Delta S < 0$.

Э. Годдард и соавт. [41] наблюдали, что образование мицелл из

Термодинамические параметры перехода углеводородов в воду

Переход	Температура, К	ΔS , ккал/(моль · град)	ΔH , ккал/моль	ΔG , ккал/моль
C_2H_6 в бензоле $\rightarrow C_2H_6$ в воде	298	-19,8	-2,3	3,8
C_2H_4 в бензоле $\rightarrow C_2H_4$ в воде	298	-14,7	-1,5	2,9
C_2H_6 в $CCl_4 \rightarrow C_2H_6$ в воде	298	-14,9	-1,6	3,7
Жидкий $C_3H_8 \rightarrow C_3H_8$ в воде	298	-22,9	-1,7	4,9
Жидкий $C_4H_{10} \rightarrow C_4H_{10}$ в воде	298	-22,9	-1,0	5,8
Жидкий $C_6H_6 \rightarrow C_6H_6$ в воде	291	-13,8	0	4,0

молекул детергентов в воде сопровождается малым тепловым эффектом, а следовательно, и большим увеличением энтропии. Впервые Дж. Батлер в 1937 г. объяснил тепловые и энтропийные эффекты растворения в воде углеводородов изменениями, происходящими главным образом в водной фазе при добавлении неполярных молекул, а не в самом углеводороде [38]. Г. Франк и М. Эванс [35] пришли к заключению, что природа таких эффектов связана с реорганизацией молекул воды вблизи неполярной группы и образованием короткоживущей квазикристаллической структуры, которую они называли "айсбергом". Эта структура менее беспорядочна и имеет лучшую систему водородных связей, чем чистая вода при той же температуре. "Айсберги" различны в разных системах и отличаются от структуры обычного льда. Это, например, следует из того факта, что образование льда из воды ведет к увеличению объема, а возникновение "айсбергов" – к его уменьшению. Структурированное состояние воды вокруг неполярных молекул получило также название "мерцающих кластеров" [42–44], "кластерных оболочек" и "полиэдрических клеток", подобных существующим в кристаллогидратах [45]. Во всех вариантах терминологии подчеркивается роль молекул неполярного вещества как "структурных творцов" окружающей среды.

Из рассмотрения поведения углеводородов в воде Козман [4] делает следующие выводы относительно гидрофобных взаимодействий в белках, отражающих специфические структурные и термодинамические свойства воды.

1. Гидрофобные взаимодействия оказывают стабилизирующее воздействие на структуру белка главным образом за счет энтропийного эффекта. На каждую неполярную алифатическую боковую цепь, которая покидает водное окружение, можно ожидать увеличение энтропии около 20 кал/(моль · град).

2. Переход алифатической боковой цепи из воды в неполярную область является эндотермическим процессом ($\Delta H > 0$).

3. Гидрофобные взаимодействия приводят к понижению свободной энергии системы белок–вода. Изменения ΔG на одну неполярную группу составляют при комнатной температуре 3,0–5,0 ккал/моль.

4. Из-за эндотермичности перехода неполярных групп из воды в неполярное окружение стабилизация белковой глобулы за счет гидрофобных взаимодействий больше при комнатной температуре, чем при 0°.

5. Реализация гидрофобных взаимодействий при образовании глобулы должна сопровождаться увеличением объема раствора.

Часть углеводородных групп в молекуле белка, которые могут осуществлять гидрофобные взаимодействия, велика. К ним относятся боковые цепи остатков валина, лейцина, изолейцина, фенилаланина, триптофана, пролина и аланина. У большинства белков эти остатки составляют 35–45% всего аминокислотного состава. В гидрофобных взаимодействиях могут участвовать и углеводородные фрагменты полярных боковых цепей. У. Козман предполагает, что пептидных водородных связей вполне достаточно для стабилизации нативной конформации белка. О большой роли гидрофобных взаимодействий свидетельствует сильный денатурирующий эффект слабополярных растворителей, в частности спиртов. Действие таких растворителей определяется контактами с углеводородными группами, которые нарушают гидрофобные взаимодействия. Денатурирующее действие спиртов на белки возрастает с увеличением размеров алифатического радикала. Сильный денатурирующий эффект мочевины и гуанидиновых солей также объясняется их способностью ослаблять гидрофобные взаимодействия. В то же время известно, что электролиты, как правило, являются слабыми денатурирующими агентами. Это, по-видимому, связано с тем, что солевые связи в белке не вносят существенного вклада в стабилизацию нативной конформации.

Д. Поланд и Г. Шерага [46, 47] предприняли попытку построить количественную теорию гидрофобных взаимодействий, основанную на трактовке У. Козмана и разработанных Г. Немети и Г. Шерагой [44, 48, 49] моделях структуры воды. Г. Немети и Г. Шерагой в 1962 г. была предложена статистическая модель воды, учитывающая пять ее состояний: без водородных связей, с одной, двумя, тремя и четырьмя водородными связями. Введение гидрофобной молекулы увеличивает координационное число льдоподобной структуры (четыре водородные связи) и, следовательно, понижает энергию молекулы. Энергия остальных четырех состояний, напротив, повышается предположительно на одну и ту же величину. В результате из полуэмпирического выражения статистической суммы рассчитываются ΔG , ΔH и ΔS , отвечающие контактам любых пар неполярных боковых групп белковой молекулы. Найденные значения для разных групп при 25° варьируют для ΔG от –0,2 до –0,5 ккал/моль, ΔH – от 0,4 до 1,8 ккал/моль и ΔS – от 1,7 до 10 кал/(моль · град). Эти количественные оценки согласуются с качественными представлениями, но не более того. Сама структурная теория воды, основанная на модели смеси четко различающихся видов структур, не согласуется с рядом спектроскопических данных.

свидетельствующих в пользу практически непрерывного распределения структур воды.

Г. Фишером в 1964 г. предпринята попытка оценить влияние гидрофобных взаимодействий на форму глобулы из соотношения объемов гидрофильных и гидрофобных боковых цепей [50]. Форма глобулы ищется в предположении, что под влиянием гидрофобных взаимодействий неполярные остатки располагаются внутри, а полярные — на поверхности глобулы, образуя мономолекулярный слой; объем всех остатков считается примерно одинаковым. Г. Фишер получил аналитическое выражение отношения числа гидрофобных к числу гидрофильных остатков (b) как функцию объема глобулы (V_t). Сравнение теоретической кривой $b = f(V_t)$, полученной для сферы, с экспериментальными значениями V_t и b сделано для 35 белков. Экспериментальные точки обнаруживают большой разброс и, как правило, находятся выше теоретической кривой. Это означает, что белки отступают от сферической формы. В следующей работе Фишер учел условия гидратирования молекулы белка, предположив, что поверхность белка покрыта равномерным мономолекулярным слоем воды. Однако и здесь, как и в предыдущем случае, результаты расчета имеют характер ориентировочных оценок. В расчетах игнорируется не только многообразие полярных и неполярных остатков, но и их последовательность. Условным является само разделение природных аминокислот только на две группы, поскольку все полярные боковые цепи включают углеводородные части.

К. Тэнфорд [51–53] предложил классифицировать остатки по степени их гидрофобности, количественной мерой которой является изменение свободной энергии ΔG , приходящееся на боковую цепь свободной аминокислоты, при переносе ее из этанола в воду. За нуль принято значение ΔG для глицина. Расположение остатков согласно значениям ΔG не совпадает с их классификацией по полярности. По Тэнфорду, степень гидрофобности лизина, гистидина, аргинина имеет примерно такое же значение, что и для валина, метионина, аланина.

Дж. Брандтс [54–59] в соответствии с идеей Фишера рассматривал не два, а три типа остатков: гидрофобные, находящиеся преимущественно внутри глобулы; гидрофильные, располагающиеся на поверхности; и нейтральные (глицин, серин, цистеин, аспарагин и глутамин). Числа заполнения внутренних и внешних ячеек для каждого типа остатков взвешиваются в соответствии со свободной энергией переноса остатков внутрь и со статистическим вырождением. Это дает возможность написать статистическую сумму для глобулы и построить статистико-термодинамическую теорию денатурации белка.

Работы Фишера, Тэнфорда и Брандтса имеют феноменологический характер и основываются на представлении об определяющей роли гидрофобных взаимодействий. Однако подобный подход исключает рассмотрение структур конкретных белков и не содержит анализа многих других факторов, ответственных за пространственную организацию молекул.

Гидрофобные взаимодействия, являющиеся по своей природе энтропийным эффектом, не приводят к возникновению каких-либо новых, дополнительных сил, и поэтому выражение "гидрофобные силы" лишено физического смысла. Такие взаимодействия возникают из-за водного окружения молекулы белка и из-за специфической структуры воды. Для полярных и неполярных групп белка гидрофобные взаимодействия играют ориентирующую роль; следствием их является образование наиболее предпочтительных внутри- и межмолекулярных контактов между родственными по своей природе группами. Сами же контакты и их эффективности описываются обычными ван-дер-ваальсовыми взаимодействиями, электростатикой и водородными связями с учетом влияния среды. Водное окружение может способствовать образованию ионных пар или солевых связей, так как при этом освобождается часть ориентированных молекул воды, окружавших заряженные группы, и, следовательно, увеличивается энтропия воды. Показано [4], что в ряде случаев выигрыш энтропии оказывается более значителен, чем ослабление энергии кулоновских взаимодействий зарядов в водном окружении. При добавлении неводных растворителей солевые связи в отличие от гидрофобных взаимодействий усиливаются.

Подводя итог развитию представлений о стабильности белковой молекулы в 1950–1960-е годы, следует прежде всего отметить некоторый отход от господствующей прежде концепции о пептидной водородной связи как решающего или даже единственного фактора, ответственного за структуру белка. Полученный в этот период большой экспериментальный материал по структуре глобулярных и фибриллярных белков и синтетических полипептидов не мог быть объяснен только на основе такой концепции. Опытные данные свидетельствовали о чрезвычайной чувствительности конформации пептидного остова к природе остатков, их последовательности, растворителю, температуре, значению pH, длине цепи и т.д. Более того, был получен целый ряд факторов, прямо противоречащих концепции об определяющей роли пептидных водородных связей. Например, обнаружено, что слабополярные органические растворители являются сильными денатурирующими агентами. Между тем, они значительно меньше ослабляют пептидную водородную связь, чем вода, и, следовательно, с позиции указанной концепции можно было бы ожидать увеличения стабильности нативной конформации, а не ее разрушения, как это имеет место.

При трактовке опытных данных все больше начинает подчеркиваться роль взаимодействий белковых цепей друг с другом и с пептидным остовом, взаимодействий белка с молекулами окружающей среды. Становится очевидным, что эти взаимодействия не ограничиваются только водородными связями, а их природа более разнообразна. В создание глобулы вносят вклад и дисперсионное притяжение, ионные пары, электростатические взаимодействия, π -взаимодействия ароматических остатков, водородные связи боковых цепей. Существенны здесь не только энергетические факторы, но и энтропийные. Разрабаты-

вается концепция гидрофобных взаимодействий, которым, как в свое время пептидным водородным связям, начинают придавать фундаментальное значение. Новые экспериментальные факты, полученные при расшифровке трехмерных структур миоглобина, гемоглобина и лизоцима, свидетельствовали о том, что пространственное строение белков определяется комплексом многих взаимодействий. Однако ввиду сложности проблемы анализ факторов, стабилизирующих структуры белков, носит еще чисто описательный характер или производится на основе упрощенных моделей, отражающих лишь отдельные, взятые изолированно виды взаимодействий. По-прежнему предполагается, что "...макромолекулы белков свертываются в спиральную вторичную структуру вследствие образования огромного числа внутримолекулярных водородных связей, а спиральные участки изгибаются и складываются в компактную третичную структуру, определяемую тонким балансом различных молекулярных сил сцепления и отталкивания" [34. С. 10]. И еще одна дополняющая это расхожее представление характеристика пространственной организации белка: "Третичная структура глобулярных белков представляет собой топологически сложную упаковку α -спиральных областей, соединенных аморфными областями полипептидной цепи" [34. С. 33].

Что касается гидрофобных взаимодействий, о которых еще придется говорить, то следует отметить, что многочисленные исследования в течение последних десятилетий не привели к заметному прогрессу как в понимании этого явления, так и его использовании для решения прикладных задач [60]. Концепция Козмана и по сей день остается чисто феноменологической. На ее основе так и не удалось создать количественной теории, которая хотя бы в малой степени обладала предсказательной силой в оценке роли гидрофобного эффекта в структурной организации молекул белка.

Глава 8

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВТОРИЧНЫХ СТРУКТУР БЕЛКОВ

В большинстве работ эмпирические правила выводятся путем статистического анализа белков известного пространственного строения. В ряде других исследований привлекаются также термодинамические функции перехода спираль-клубок синтетических полипептидов, используются атомные модели, стереохимические правила и данные различных физико-химических методов; есть работы, в которых эмпирический подход сочетается с расчетом упрощенных моделей белковой цепи. Таким образом, методологической основой рассматриваемого круга исследований служат статистический анализ, стереохимия и равновесная термодинамика.

В этой главе в хронологическом порядке рассмотрены исследования эмпирического подхода, в которых пытаются предсказывать вторичные структуры по аминокислотной последовательности и выработать правила свертывания белковой цепи на локальных участках.

8.1. АЛГОРИТМЫ ПРЕДСКАЗАНИЯ ВТОРИЧНЫХ СТРУКТУР

Впервые А. Гуццо в 1965 г. использовал для предсказания конформационных состояний аминокислотных остатков статистический анализ из распределения в спиральных и неспиральных областях миоглобина и α - и β -цепей гемоглобина [61]. Выполненная им классификация остатков на стабилизирующие и дестабилизирующие α -спирали противоречила конформационной гипотезе Блоута и соавт. [62]. И. Протеро [63], используя также статистический подход, но на большем экспериментальном материале, показал, что правило Гуццо приводит к ошибочным выводам для ряда белков, и сформулировал свои критерии образования спиральных сегментов.

Б. Хэвстин [64] рассмотрел корреляцию между аминокислотным составом и степенью спиральности у 40 белков, определенной по параметру b_0 в уравнении Моффита–Янга. Полученные данные согласовывались с гипотезой Блоута и предположением Кендрию о разрушающем влиянии на α -спираль остатков Ser и Thr, хотя четкой зависимости обнаружено не было. Б. Хэвстин высказал предположение о том, что генетический код задает нативную конформацию белка, т.е. компоновку третичной структуры из вторичных, регулярных форм, путем локализации в последовательности остатков Ser и Thr, а также Pro и Cys для прерывания α -спирали.

П. Перитти и соавт. [65] проанализировали частоту появления в спиральных и неспиральных областях миоглобина пар остатков, разделенных 0, 1, ..., 5 остатками. Интересный и новый момент в этом исследовании заключался в предположении, что влияние данного остатка на стабильность α -спирали определяется не только его собственной природой, но и характером соседних остатков в последовательности.

Предсказательный алгоритм М. Шиффера и А. Эдмундсона также основан на предположении о важности взаимодействий между соседними остатками по цепи [66]. Авторы посчитали, что для стабилизации α -спирали наиболее существенна природа остатков в положениях n , $n\pm 3$ и $n\pm 4$, при которых они оказываются сближенными. Впервые это было отмечено Б. Лоу и Дж. Эдсаллом [67]. М. Шиффер и А. Эдмундсон, основываясь только на данных по трем белкам (миоглобин, гемоглобин и лизоцим), показали, что находящиеся в положениях n , $n\pm 3$ и $n\pm 4$ неполярные остатки группируются на одном краю спирали и тем самым обеспечивают как устойчивость самих спиральных сегментов, так и образование благоприятных межспиральных контактов путем создания гидрофобных ядер.

Д. Кук в 1967 г. [68] рассмотрел частоты появления остатков на разных участках α -спирали и пришел к заключению, что отрицательно заряженные аспарагиновая и глутаминовая кислоты и треонин встречаются преимущественно на N-концах, а положительно заряженные лизин, аргинин и гистидин – на C-концах α -спирали. Б. Лоу и соавт. [69] исходили из предположения, что формирование α -спирали является кооперативным процессом, который определяется взаимодействием ближайших остатков белковой цепи. В связи с этим спиралеобразующая тенденция отнесена авторами не к отдельным остаткам, а к определенным последовательностям.

В табл. II.2 приведены результаты рассмотренных выше исследований α -спирального содержания, основанных на статистической обработке данных нескольких белков. Сопоставление экспериментальных и теоретических данных свидетельствует о чрезвычайно малой предсказательной силе первых эмпирических корреляций. Можно было, однако, полагать, что это связано с недостаточным для корректной статистической обработки количеством белков с известной пространственной структурой.

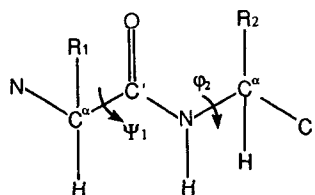
О.Б. Птицын [70] проанализировал распределение остатков на N- и C-концах, а также в средней части спиралей у большего, чем в аналогичной по характеру работе Д. Кука [68], числа аминокислотных последовательностей. Автор показал, что гидрофобные остатки аланина и лейцина обнаруживают тенденцию находиться во внутренних витках α -спиралей, а остатки с отрицательно и положительно заряженными боковыми цепями – концентрироваться соответственно на ее N- и C-концах. Аминокислоты с гетероатомом при C^β локализуются в неспиральных областях.

Д. Котельчук и Г. Шерага [71, 72] предприняли попытку теоретически обосновать гипотезу о доминантной роли в образовании вторичных структур ближних взаимодействий, т.е. взаимодействий атомов в пределах одного остатка. При справедливости этой гипотезы природные аминокислотные остатки могли бы быть количественно охарактеризованы специальными потенциалами, что сделало бы возможным предсказывать конформации отдельных фрагментов последовательности и составить таким образом грубое приближение белковой глобулы для последующего уточнения. Расчетная модель имела вид, показанный на рис. II.2. Исходные двухгранные углы ϕ , ψ отвечали правой и левой α -спиралям (α_R и α_L) и складчатому листу (β). Конформационные состояния боковых цепей (R) во всех случаях фиксировались одинаковым образом в полностью вытянутой форме с χ^1 , χ^2 , ... = 180° , 180° , Было найдено, что при различной форме основной цепи (α_R , α_L , β) предпочтительная конформация дипептида при неизменном состоянии R_1 оставалась той же самой, независимо от природы R_2 . В определении стабильности конформации такой системы, согласно Котельчуку и Шераге, важное значение имеет лишь взаимодействие боковой цепи R_1 с промежуточной пептидной группой; взаимодействие же между R_1 и R_2 незначительно и практически не влияет на

Предсказательная способность первых эмпирических корреляций

Белок	Число α -спиральных остатков (экспериментальные данные)	Оценка	Предсказание числа α -спиральных остатков				
			А. Гушо [61]	И. Протеро [63]	П. Перитти и соавт. [65]	М. Шиффер и А. Эдмундсон [66]	Б. Лоу и соавт. [69]
Лизоцим	41	Правильная	39	30	—	34	15
		Неправильная	66	9		27	1
Рибонуклеаза А	24	Правильная	—	19	17	15	18
		Неправильная		19	15	18	1
Миоглобин	119	Правильная	—	100	—	82	4
		Неправильная	—	16	—	2	0
α -Химотрипсин	8	Правильная	—	2	—	4	7
		Неправильная	—	115	—	91	44

конформацию. Авторы сделали вывод, что образование α -спиралей и β -структур является результатом аддитивных вкладов отдельных остатков, а не следствием их взаимодействий. На основе результатов расчета и анализа последовательностей в четырех белках они разделили аминокислоты на спиралеобразующие (Ala, Val, Leu, Ile, Met, Thr, Gln, Glu, Phe, Cys, His и Arg) и спиралеразрушающие (Ser, Asn, Asp, Trp, Tyr и Lys). Остаток Gly отнесен к индифферентным, а Pro – к спиралеобразующим по отношению к С-концу последовательности и к спиралеразрушающим по отношению к N-концу. Были также сформулированы эмпирические правила идентификации спиральных и неспиральных областей, включающие условия инициации и терминации спиралей.



Р и с. II.2. Расчетная модель дипептидного фрагмента [72]

Результаты работ Котельчука и Шераги соответствовали модели Полинга и Кори и, очевидно, в связи с этим не были критически восприняты многими исследователями, что способствовало распространению упрощенного представления о формировании структуры белковой молекулы. Однако данная работа содержит ряд серьезных недостатков и необоснованных заключений. Неудачен сам выбор расчетной модели, исследование которой в принципе не могло дать ответ на вопрос о взаимодействии смежных остатков при трех канонических формах основной цепи. Так, в случае β -структурных параметров ϕ , ψ боковые цепи R_1 и R_2 находятся по разные стороны от основной цепи, причем одна направлена вверх от средней плоскости складчатого листа, а другая – вниз, в результате боковые цепи ни при каких конформационных состояниях R_1 и R_2 не могут эффективно взаимодействовать между собой. В β -структуре сближенными оказываются боковые цепи не смежных остатков, а разделенные одним остатком, т.е. R_1 и R_3 , R_2 и R_4 , взаимодействие между которыми может стабилизировать эту структуру. Следовательно, выбранная модель не отражает специфику взаимодействий боковых цепей в конформации складчатого листа.

При фиксированных в расчете состояниях R_1 и R_2 боковая цепь первого остатка нависает над промежуточной пептидной группой, а второго – ориентирована в сторону от фрагмента. Полученный Котельчуком и Шерагой результат об отсутствии взаимодействий между R_1 и R_2 и значительном взаимодействии с прилегающей пептидной группой заведомо очевиден из принятых условий расчета. Таким образом, выводы Котельчука и Шераги об аддитивном характере β -структуры и α -спирали и, следовательно, неэффективности взаимодействий смежных остатков априорно следуют из принятой расчетной модели и не отражают реальной ситуации. Что касается сделанных на основе расчета предсказаний спиральных и неспиральных областей, то их достоверность, как видно из табл. II.3, столь же мала,

**Показательная способность эмпирического правила
Котельчука и Шераги**

Белок	Число α -спиральных остатков (экспериментальные данные)	Оценка	Число α -спиральных остатков по данным Д. Котельчука и Г. Шераги [71, 72]
Лизоцим	54	Правильная	31
		Неправильная	34
Рибонуклеаза А	24	Правильная	10
		Неправильная	26
Миоглобин	121	Правильная	74
		Неправильная	51
α -Химотрипсин	22	Правильная	9
		Неправильная	51

как и в предшествующих работах (см. табл. II.2). Гипотеза о доминантной роли внутриостаточных невалентных взаимодействий атомов в формировании регулярных структур была очень заманчива. Она вселяла надежду найти прямую корреляцию между первичной и вторичной структурами, что, в свою очередь, обеспечило бы выход к предсказанию всей конформации белка, поскольку его трехмерная структура представлялась в виде ансамбля вторичных регулярных структур. Полученные Котельчуком и Шерагой результаты хорошо согласовывались с общепринятым представлением о пространственном строении белка и поэтому были восприняты как теоретическое обоснование подхода к решению конформационной проблемы.

Следуя за Д. Котельчуком и Г. Шерагой, А.В. Финкельштейн и О.Б. Птицын [73] в 1971 г. попытались подтвердить тезис об исключительной роли ближайших взаимодействий данными статистического анализа аминокислотного состава и последовательностей девяти белков. С этой целью было рассмотрено распределение пар различных остатков в положениях 1-2 и 1-3, 1-4 и 1-5 в α -спиральных, β -структурных и неупорядоченных участках. Анализ показал, что оно лишь незначительно отклоняется от беспорядочного. Следовательно, не было обнаружено заметной корреляции между чередованием в цепи полярных и неполярных остатков и вторичной структурой. Преимущественная локализация гидрофобных остатков в положениях 1-4 и 1-5 в спиралах миоглобина и гемоглобина была признана нехарактерной для спиралей в других белках.

При рассмотрении аминокислотного состава регулярных и нерегулярных участков, а также состава вдоль α -спиралей было, однако, замечено отклонение в распределении отдельных остатков от среднестатистического, что находилось в согласии с данными, полученными ранее Куком [68] и Птицыным [70]. Тем не менее Финкельштейн и Птицын заключили, что среди взаимодействий, определяющих вторичную структуру, взаимодействия боковых групп с примыкающими к ним участками основной цепи, т.е. во фрагменте CONH-CHR-CONH.

играют значительно большую роль, чем взаимодействия между соседними боковыми группами. На этом основании аминокислотам приписывалась определенная тенденция к встраиванию в спиральные и β -структурные участки независимо от их соседей по цепи. Далее, все природные аминокислоты разбивались на несколько групп, которые характеризовались в чисто качественном плане спиральными потенциалами. Например, остаткам Ala, Leu и Met был приписан "большой положительный потенциал", а Arg, His и Lys – "большой положительный" на С-конце и "большой отрицательный" на N-конце спирали и т.п. Эти потенциалы в общем отвечали разделению остатков на спиралеобразующие и спираленеобразующие Котельчуком и Шерагой. Для β -структуры соответствующих характеристик не было получено из-за малого объема экспериментального материала.

В серии работ П. Льюиса и Г. Шераги [74, 75] рассмотрен механизм свертывания полипептидных цепей в белках при учете только ближних взаимодействий. Предполагалось, что в процессе ренатурации или сразу же после биосинтеза самосборка белковой цепи в нативную конформацию начинается с образования α -спиралей, которые в дальнейшем и определяют направление свертывания окончательной структуры. Следовательно, в этих работах постулировалось, что регулярные конформации являются самыми стабильными формами в гетерогенной последовательности, составляют жесткую основу глобулы и играют ключевую роль в процессе самосборки белковой цепи. Сближенность спиралей и образование контактов между ними осуществляются так называемыми β -изгибами. С. Венкатачалам ранее показал, что поворот цепи на 180° может происходить на участке из четырех остатков с определенными комбинациями форм их основных цепей [76]. Позднее Е.М. Поповым и сотрудниками была получена энергетическая оценка всех возможных конформационных состояний двух центральных остатков тетрапептида, обеспечивающих такой поворот цепи [77]. П. Льюис и Г. Шерага рассмотрели аминокислотный состав тетрапептидов в трех белках известной структуры и отметили повышенную тенденцию находиться в β -изгибах у остатков Ser, Thr, Asn, Asp, Glu, Pro, Trp и Tyr [74]. Поворотные сегменты являются менее гидрофобными, чем белок в целом. Вначале авторы полагали, что в образовании изгибов, как и в случае регулярных структур, важное значение имеют лишь ближние взаимодействия. Это послужило основой определения вероятности локализации каждого остатка в одном из четырех мест β -изгиба независимо от соседей. Вероятность появления изгиба определялась как произведение индивидуальных вероятностей четырех остатков, найденных с помощью статистического анализа. В дальнейшем при рассмотрении аминокислотного состава 135 β -изгибов в структурах восьми белков к остаткам, имеющим наибольшую склонность образовывать повороты цепи, Льюис и Шерага отнесли Ser, Thr, Asp и Asn [78]. На основе расчета трех тетрапептидов в различных конформационных состояниях, имеющих изгибы, они пришли к заключению, что в местах поворота цепи остатки не ведут себя независимо. Их конформации взаимообусловлены и, кроме того, подвержены влиянию

дальних взаимодействий. А если это так, то, по мнению авторов, нельзя, исходя из статистического анализа, выработать правила предсказания из-за огромного разнообразия тетрапептидных последовательностей 20 аминокислотных остатков и большого числа конформационных вариантов, которые могут приводить к поворотам белковой цепи. Выход авторы видят в теоретическом анализе.

Механизм самоорганизации белковых молекул, аналогичный предложенному Льюисом и сотрудниками, был в чисто описательном плане позднее рассмотрен также О.Б. Птицыным [79]. До этого изучение кинетики обратимой денатурации ряда белков К. Анфинсеном, К. Тэнфордом, Д. Кошландом и другими привело к заключению, что укладка полностью развернутой пептидной цепи в глобулярную структуру начинается с образования на отдельных участках цепи конформационно жестких нуклеаций и без существенных изменений входит в нативную структуру. Придерживаясь такого механизма, Птицын, как и ранее Льюис и Шерага, полагает, что зародышевыми конформациями являются спиральные и вытянутые вторичные структуры. Стабилизация отдельных регулярных структур на ранней стадии самоорганизации определяется главным образом индивидуальными свойствами аминокислот, а стабилизация объединенных вторичных структур на последующей стадии – взаимодействием соответствующим образом расположенных полярных и неполярных остатков. В то же время в противоположность этому утверждению О.Б. Птицын подчеркивает, что конформационная устойчивость каждого участка цепи в свернутой форме молекулы обусловлена силами его взаимодействия с гидрофобным ядром и молекулами воды. "По сравнению с этими мощными силами, – пишет О.Б. Птицын, – небольшие различия между спиралеобразующими и спираленеобразующими остатками практически полностью теряют свое значение. В результате локализация спиральных участков в компактной глобуле определяется не сгущениями спиралеобразующих аминокислот, а тем, может ли та или иная аминокислотная последовательность, будучи закручена в спиральную структуру, встроиться в глобулу" [79. С. 66]. Помимо того, что это предположение противоречит другим, сделанным автором в той же статье, оно ставит под сомнение не только большую роль ближних взаимодействий в образовании вторичных структур, что утверждалось ранее, но, что более существенно, и саму возможность предсказывать структуры с помощью статистического анализа.

Если регулярные конформации являются действительно результатом дальних взаимодействий, которые практически нивелируют спиралеобразующие и спираленеобразующие потенциалы остатков (иными словами, теперь уже третичная структура создает набор вторичных), то, очевидно, теряется смысл в статистическом поиске корреляций между последовательностью аминокислот и трехмерной структурой. Именно такую точку зрения высказали Н.Г. Есипова и В.Г. Туманян в 1972 г. [80]. Авторы считают, что все попытки установить прямую связь между аминокислотной последовательностью и вторичной структурой обречены на неудачу, так как они не могут привести к

пониманию принципов формирования глобулы, во-первых, поскольку регулярные конформации не являются доминирующими в молекулах большинства белков, а во-вторых, вследствие их зависимости от третичной структуры. Н.Г. Есипова и В.Г. Туманян предложили модель пространственной структуры белка как системы из относительно прямых сегментов с узловыми точками перегибов между ними. Повороты полипептидной цепи трактуются как гибкие шарниры или жесткие участки, меняющие за счет взаимодействий входящих в них остатков направления цепи. Оба подхода основаны на статистическом анализе известных нативных конформаций и принципиально не отличаются друг от друга.

Развивая представление о важности индивидуальных вкладов остатков в формирование α -спиралей, Льюис и Шерага предложили использовать для их количественной оценки термодинамические параметры s и σ феноменологической теории переходов спираль-клубок синтетических полимеров Б. Зимма и Дж. Брэгга. Параметр s представляет собой константу равновесия перехода мономерного звена из неупорядоченной клубковой формы (c) в упорядоченное α -спиральное состояние (h), которое включает по крайней мере три предшествующих остатка; иными словами, параметр s описывает переход $\dots h, h, h, c \dots \rightarrow \dots h, h, h, h \dots$. Параметр σ является константой равновесия перехода мономерного звена из состояния c , которому предшествуют три (или более) звена в этой же форме, в состояние h : $\dots c, c, c, c \dots \rightarrow \dots c, c, c, h \dots$. Состояние h более выгодно энергетически, а состояние c более предпочтительно по энтропии. Поэтому свободная энергия таких состояний различным образом меняется в зависимости от внешних условий. Теория перехода спираль-клубок базируется на одномерной модели Изинга, которая неприменима непосредственно к трехмерной структуре белка, но может быть использована для описания его денатурированного состояния при отсутствии взаимодействий между остатками.

П. Льюис и Г. Шерага впервые предложили рассчитывать профили вероятности спирального содержания развернутой белковой цепи с помощью параметров s и σ , найденных экспериментально из кривых плавления переходов спираль-клубок синтетических полипептидов [74]. Они полагали, что поиск корреляции между рассчитанными таким образом профилями вероятности содержания α -спиралей для денатурированных белков и экспериментально наблюдаемыми α -спиральными областями в нативной структуре окажется более перспективным по сравнению с попытками установить связь с помощью статистического анализа между аминокислотной последовательностью и вторичными структурами, а также между последними и третичной структурой. Предполагается следующая схема свертывания белковой цепи в глобулу. Первоначально на некоторых участках полностью развернутой белковой цепи возникают α -спирали. Регулярное свертывание цепи происходит не за счет кооперативных взаимодействий остатков, а в соответствии с потенцией отдельных аминокислот. Далее, флуктуация цепи в разделяющих спирали областях, специфика которых, согласно

Льюису и Шераге, также определяется индивидуальными свойствами остатков, приводит к возникновению β -изгибов и реализации взаимодействий между спиралями, что в конечном счете вызывает их схлопывание.

Регулярные структуры, возникающие на ранней стадии ренатурации, переходят с изменением или без существенных изменений в третичную структуру. Все аминокислоты были разделены на три группы, которым приписаны значения $s = 0,385$ (спиралеразрушающие остатки Gly, Pro, Ser, Asn), $s = 1,00$ (индифферентные – Phe, Tyr, Lys, Arg, Cys, Asp) и $s = 1,05$ (спиралеобразующие); значение σ во всех случаях считалось неизменным. Были построены профили вероятности спирального содержания для 11 белков, которые затем сопоставлены с наблюдаемыми структурами. Полученное совпадение нельзя назвать удовлетворительным. Например, у папаина (211 остатков) в спиральные конформации входят 44 остатка; правильно предсказаны 33, неправильно – 70. У рибонуклеазы А (124 остатка) в α -спиралях содержится 24 остатка; правильно предсказано 18, неправильно – 36. Подобная картина имеет место и у других белков. Остатки, не включенные в спирали, были отнесены к клубковому состоянию, т.е., по существу, остались неидентифицированными.

Позднее А.И. Денисюк, О.Б. Птицын и А.В. Финкельштейн использовали для расчета вероятности спирального содержания белков подход Льюиса и Шераги, основанный на учете индивидуальных конформационных свойств аминокислотных остатков с помощью параметров s и σ теории Зимма и Брэгга и одномерной модели Изинга [81]. В данном случае аминокислоты были разбиты не на три группы, а на шесть. Остаткам, отнесенным к спиралеобразующим (Glu, Leu, Phe, Ile, Met, Val, Lys, Ala, His, Arg), приписаны значения s от 1,3 до 1,1, спиралеразрушающим (Ser, Thr, Asp, Asn, Tyr, Gly, Pro, Cys) – $s = 0,75$ – $0,6$ и индифферентным (Gln, Trp) – $s = 1,0$. Вычисленные профили вероятности спирального состояния аминокислотных последовательностей сравнимы с профилями известных структур.

В некоторых случаях предсказанные максимумы качественно согласуются с наблюдаемыми спиральными участками в глобуле; в других, а их большинство (конканавалин, рубредоксин, трипсиновый ингибитор, химотрипсин, эластаза, трипсиноген), даже качественного согласия нет. Авторы предполагают, что дальние взаимодействия фиксируют те спиральные участки, для которых гипотеза о большой роли ближних взаимодействий в образовании спиральных структур белков предсказывает максимальную вероятность реализации α -спирали. Следовательно, допускается наличие согласованности в третичной структуре ближних и дальних взаимодействий. Однако считается, что это не имеет решающего значения в стабилизации нативного положения спиральных участков, локализация которых определяется в основном дальними взаимодействиями, как наиболее специфическими. Тем не менее, вступая в некоторое противоречие с подобным заключением, а также с наиболее ранними высказываниями, авторы делают вывод, что согласованность ближних и дальних взаимодействий

может играть определяющую роль в самоорганизации нативной структуры [79]. При наличии согласованности конформация белка собирается из отдельных спиральных участков, как из блоков, что и обуславливает быстроту и безошибочность этого процесса. Аналогичная трактовка механизма самосборки третичной структуры ранее была сделана в работах Гуццо, Льюиса, Шераги и др.

Простейший статистический подход, не учитывающий взаимодействия даже между смежными остатками, был использован Ф. Бегхином и Дж. Дирксом, Дж. Кроуфордом и соавт. [82, 83]. Алгоритмы предсказания строились по статистическим оценкам склонностей остатков входить в α -спирали, β -структуры и β -изгибы. Соответствующие потенциалы рассчитывались из частот встречаемости каждого из 20 стандартных остатков в перечисленных вторичных структурах. Точность предсказания алгоритмов Диркса и Кроуфорда невысока.

Серию интересных исследований выполнили Е. Каба и Т. Ву [84–87]. Придерживаясь традиционного представления Полинга и Кори о структуре белка, они попытались локализовать спиральные и неспиральные участки на основе статистического анализа конформационного состояния каждого остатка (n) с учетом влияния предшествующего ($n-1$) и последующего ($n+1$) остатков. Авторы составили таблицу конформационных состояний трипептидов, основанную на данных по 11 белкам известной структуры. В них содержится лишь 15% общего количества возможных тройных комбинаций стандартных природных аминокислот, что недостаточно для предсказания α -спиральных, β -структурных и нерегулярных участков. Поэтому предложенный Каба и Ву эмпирический алгоритм применим только для серий гомологичных белков и при использовании других, менее очевидных критериев отбора. Метод был опробован на цитохроме *c*, для которого известна трехмерная структура и имеются данные о последовательностях 18 гомологов. Даже в таком благоприятном случае удовлетворительного совпадения достигнуто не было. Из 24 остатков, входящих в α -спирали, правильно предсказаны 20 при 24 ошибках; остальные остатки (80) не идентифицированы.

Собранный Каба и Ву экспериментальный материал позволяет заключить, что конформационное состояние аминокислотного остатка в гетерогенной цепи далеко не в полной мере определяется его собственной потенцией принимать определенное конформационное состояние и встраиваться в соответствующую вторичную структуру. Напротив, эксперимент показывает, что у большинства остатков отсутствует ярко выраженная потенция и они обладают по ближним взаимодействиям большой конформационной свободой и могут приблизительно с одинаковой вероятностью находиться в различных низкоэнергетических областях потенциальной поверхности и занимать в каждой области положения с весьма отличающимися значениями геометрических параметров. Это никак не согласуется с гипотезой о доминантной роли в образовании вторичных структур взаимодействий атомов в пределах одного остатка. Алгоритм предсказания Каба и Ву

основан на предположении о том, что два ближайших соседних остатка ($n-1$ и $n+1$) предопределяют у центрального остатка (n) не только область, но и значения двухгранных углов вращения вокруг связей $N-C^{\alpha}$ (ϕ) и $C^{\alpha}-C'$ (ψ). Даже если допустить, что это действительно так, то для более или менее надежного выбора значений ϕ, ψ для одного остатка необходимо наличие экспериментальных данных, которые, по крайней мере, на порядок превышали бы число возможных трипептидных комбинаций аминокислот (8000), что требует знания третичных структур многих сотен белков. Е. Каба и Т. Ву располагали данными, составляющими менее одного процента требуемого количества, что недостаточно для предсказания вторичных структур.

Конформации трипептидных фрагментов, встречающихся в известных белках несколько раз, содержат центральный остаток в различных состояниях. Этот факт противоречит постулированному условию о том, что конформационное состояние остатка n определяется его взаимодействиями с ближайшими соседями $n-1$ и $n+1$. В α -спирали взаимодействия n с $n-1$ и $n+1$ играют определенную роль в стабилизации структуры, но, кроме того, значительными могут быть взаимодействия n с остатками $n\pm 3$ и $n\pm 4$. Следовательно, для учета энергетического вклада от взаимодействий соседних по цепи остатков в стабилизацию центрального остатка α -спирали нужно исследовать нонапептидный фрагмент. В структуре складчатого листа взаимодействия n с $n\pm 1$ менее актуальны, взаимодействия n с $n\pm 2$ остатками. Для подобной структуры требуется анализ, по крайней мере, пентапептидного фрагмента. Предсказание конформационного состояния центрального остатка в фрагментах такой длины даже в случае регулярных структур на основе статистического анализа становится нереальным в принципе, так как для этого необходимы экспериментальные данные о количестве белков, превышающем их содержание в природе.

Исследование, близкое работе Каба и Ву по своему характеру, спустя десять лет провели У. Кэбш и Х. Сандер [88]. Они проанализировали последовательности и конформационные состояния всех пентапептидных фрагментов в 62 белках известного пространственного строения. Из приблизительно 10 000 рассмотренных фрагментов в 25 случаях в совершенно разных белках были обнаружены пентапептиды с идентичными порядками аминокислот; было также установлено, что в 6 случаях (из 25) одни и те же пентапептиды имеют в белках различные конформации. Например, последовательность Val-Asn-Thr-Phe-Val в рибонуклеазе составляет часть β -структуры, а в гемоглобине она входит в α -спираль. Авторы сделали вывод о наличии зависимости пространственного строения локальных участков от всей белковой последовательности. Факт сравнительной легкости структурной адаптации олигопептидных белковых фрагментов не учитывается во всех методах предсказания вторичных структур.

Для получения эмпирических корреляций между аминокислотной последовательностью и вторичными структурами, а также для

описания механизма свертывания белковой цепи в глобулярную форму Б. Робсон и Р. Пейн применили статистическую теорию информации [89–92]. Авторы придерживались общепринятого представления о том, что нативная конформация белка представляет собой набор α -спиралей, β -структур и β -изгибов; образование вторичных структур в значительной степени определяется близкими взаимодействиями, т.е. конформационными свойствами отдельных остатков. Свертывание белковой цепи начинается с образования нуклеаций, которые, по их мнению, являются регулярными. В создании нативной конформации основное участие принимают дальние взаимодействия, направляемые вторичными структурами. Позже, в 1976 г., Б. Робсон и Е. Сузуки предположили, что в образовании некоторых структур играют роль взаимодействия между соседними по цепи остатками [93]. В связи с этим для предсказания тех же вторичных структур они использовали данные по монопептидам и 16 парам аминокислотных остатков, образованным анализируемым остатком с остатками в положениях $n \pm 1$ – $n \pm 8$. Однако, как замечают сами авторы, учесть эти взаимодействия статистическими методами, по существу, не представляется возможным. При анализе Робсон и Сузуки исходили из оценки роли каждого остатка в образовании α -спирали, складчатого листа, β -изгиба и клубка. Последовательности остатков и их конформационные состояния в белке рассматривались как два набора информации, которые связаны между собой трансляционным кодом – процессом укладки цепи в глобулярную форму.

Используя теорию информации, авторы выполнили статистический анализ зависимости между порядком и структурой сначала у 11, а позднее у 25 белков (около 4500 остатков). В результате аминокислотные остатки были количественно оценены мерой информации, характеризующей их способность входить во вторичные структуры и клубок. С помощью мер информации определены значения углов ϕ , ψ у остатков ряда белков. Точность предсказания невысока. Так, совпадение значений ϕ , ψ в пределах 40° у α -химотрипсина составило 31%, эластазы – 33%, цитохрома с – 50%, рибонуклеазы – 28%.

Статистический анализ К. Нагано основан на структурах 95 белков с известной аминокислотной последовательностью [94]. Автор предположил, что белки, родственные по биологической функции источнику эволюции и имеющие небольшие различия в первичной структуре, обладают близким пространственным строением. Они были разбиты на 13 семейств с известными кристаллографическими конформациями. В каждом белке анализировались все пары остатков, разделенных m остатками, где $m = 0, 1, 2, \dots, 6$. Путем линейной комбинации статистических величин при различных значениях m были найдены предсказательные функции для α -спирали, β -структуры, поворота цепи и клубка. Рассчитанные весовые факторы C_{ms} , характеризующие вклады взаимодействий различных типов остаточных пар (n с $n+1$, $n+2$ и т.д.; m определяет взаимное расположение в цепи пары взаимодействующих остатков, s – вид вторичной структуры) во вторичные

структуры, показали, что в образовании α -спирали самыми важными являются взаимодействия между n и $n+1$ и особенно $n+2$ ($m = 0$ и 1); в β -структуре — главным образом между n и $n+1$, а также n и $n+2$; в β -изгибе значения C_{ms} при всех значениях m оказались приблизительно одинаковыми. Однако хорошо известно, что в α -спирали сближенными оказываются боковые цепи остатков n и $n\pm 1$, $n\pm 3$ и $n\pm 4$, но не n и $n\pm 2$. Последние располагаются по разные стороны спирали и не могут взаимодействовать между собой. Большое значение соответствующего весового фактора C_{ms} ($m = 2$, s — α -спираль) определяется не взаимодействиями между боковыми цепями двух остатков, а стабилизирующими дисперсионными взаимодействиями примыкающих к n и $n+2$ пептидных групп $n-1$ и $n+1$, $n+2$, а также n , $n+1$ и $n+2$, $n+3$, которые не связаны с природой аминокислот.

Что же касается вывода Нагано о стабилизации β -структуры за счет взаимодействия между боковыми цепями смежных остатков n и $n+1$, то его также нельзя признать достаточно обоснованным. В развернутой форме цепи боковые заместители остатков n и $n+1$, как отмечалось выше, не могут эффективно взаимодействовать между собой, так как направлены в разные стороны как по отношению к оси цепи, так и к средней плоскости. На основе результатов статистического анализа Нагано были отнесены к α -спиральным участкам аминокислоты Glu, Ala, Lys, Leu, His, Phe, Met; к β -структурным — Ile, Val, Leu, Phe, Thr, Glu, Met, Cys; характерными для поворота цепи и клубка он посчитал остатки Gln, Ser, Asn, Pro, Tyr, Arg. Это отнесение не соответствует отнесениям других авторов, которые, однако, также существенно различаются между собой. Новое здесь заключается в подчеркивании исключительной роли гидрофобных остатков в образовании β -структуры. Для семи белков известного пространственного строения, информация о котором не была использована в анализе, сделано предсказание вторичных структур. Приведем данные для конканавалина (238 остатков): в α -спираль входит пять остатков, из которых при 46 ошибках ни один не был предсказан; из 115 остатков β -структуры 23 предсказаны правильно и 95 — неправильно, из 95 остатков в β -изгибах правильно определено 22 и неправильно — 93.

В.И. Лим осуществил стереохимическое исследование структуры глобулярных белков и предложил правила локализации α -спиральных и β -структурных участков [95, 96]. Он исходил из предположения, что подавляющее большинство неполярных боковых цепей составляет гидрофобное ядро, а полярных — внешнюю оболочку глобулы, экранируя гидрофобное ядро от контактов с водой. Аминокислотные последовательности белков разбиваются на четыре группы, которым приписывается различная роль в образовании вторичных и третичных структур. В первую группу включены участки, состоящие целиком из гидрофобных остатков. Предполагается, что они должны находиться внутри глобулы и образовывать преимущественно α -спирали, а также β -структуры. Вторую группу составляют участки исключительно из гидрофильных остатков. По мнению Лима, они не могут закручиваться

в α -спираль, а образуют β -структуру или нерегулярные области, расположенные на поверхности. В следующую группу входят участки с чередующимися полярными и неполярными остатками. Такая цепь в β -структурной конформации образует по одну сторону гидрофобную поверхность, утопленную в гидрофобное ядро, а по другую — гидрофильный слой, взаимодействующий с водой. Наконец, четвертую группу, единственно реальную, составляют неравномерно распределенные гидрофобные и гидрофильные остатки. Эти участки будут образовывать α -спирали при таком распределении гидрофобных остатков, которое обеспечивает их сближенность и вхождение в гидрофобное ядро. Между спиральными и β -структурными участками могут возникать конкурентные взаимоотношения. В таких случаях предпочтение отдается α -спиралям. Следовательно, β -структурные фрагменты идентифицируются после выявления α -спиралей.

Качественный стереохимический анализ молекулярных моделей привел Лима к следующему заключению: образование α -спирали происходит на участках последовательности, в которых все массивные гидрофобные боковые цепи входят в состав пар и троек, занимающих сближенные позиции: $(n, n+1)$, $(n, n+3)$, $(n, n+4)$, $(n, n+1, n+4)$ и $(n, n+3, n+4)$. На такое благоприятствующее α -спирали расположение остатков в парах ранее указывали Лоу и Эдсалл [67], Шиффер и Эдмундсон [66]. Правила, найденные для троек, не имеют самостоятельного значения; они очевидны, так как каждое из них представляет комбинацию соответствующих правил для пар остатков. В α -спирали и β -структуре нежелательно присутствие Gly и Ser в сближенных с гидрофобными остатками позициях; в то же время вхождение остатков с массивными боковыми цепями (Lys, His, Gln, Glu, Arg) стабилизирует структуры. Образование β -структуры происходит в случае полностью гидрофобного участка, участка с чередующимися гидрофобными и гидрофильными остатками, или участка с остатками Gly и Ala.

На основе этих заключений были сформулированы многочисленные правила предсказания вторичных структур. О степени их надежности можно судить по результатам сопоставления предсказанных вторичных структур с наблюдаемыми в белках известного пространственного строения. Приведем несколько примеров. В карбоксипептидазе (307 остатков) в α -спиралях находится 115 остатков; правильно предсказаны 86, неправильно — 43. В α -цепи гемоглобина (146 остатков) из 114 α -спиральных остатков идентифицированы 56 при 77 ошибках. В 20 рассмотренных Лимом белках содержится 3100 остатков; в α -спирали входят 1145, правильно отнесены 590, неправильно — 555; в β -структурах находится 425 остатков, 124 из них определены правильно, 351 — неправильно. Остатки в нерегулярных областях из 1540 случаев в 634 указаны как клубковые, а в 906 — отнесены к регулярным структурам. Эти данные взяты из работы Лима и касаются белков, использованных автором при выводе стереохимических правил. Если правила применяются к белкам, не вошедшим в состав базовых, то эффективность предсказания, как правило, значительно ниже. Например, согласно анализу Дж. Ленстры, точность предсказания методом Лима α -спирали

в трипсиногене и β -структуры в лизоциме уступает случайному отношению [97].

Обширное статистическое исследование структуры белков предприняли в 1974 г. П. Чоу и Г. Фасман [98, 99]. Как и в предшествующих аналогичных исследованиях, ставится задача предсказать вторичные структуры (α -спираль, β -складчатый лист) и клубковое состояние и на этой основе описать третичную структуру. В стабилизации регулярных форм большая роль отводится пептидным водородным связям, которые и послужили критерием в определении границ вторичных структур в известных конформациях белков. Из частот появлений каждого аминокислотного остатка в α -спиралях (f_α), их внутренних витках ($f_{\alpha i}$), складчатых листах (f_β) и клубках (f_c) рассчитаны соответствующие конформационные параметры P_α , $P_{\alpha i}$, P_β и P_c . Метод определения этих параметров исключает учет в явном виде влияния взаимодействий между остатками. Значения P_α оказались близкими значениям с теории Зимма и Брэгга, полученным для поли- α -аминокислот. Из частотного анализа остатков на границах спиральных и β -структурных областей найдены характеристики остатков, иницирующих и терминирующих вторичные структуры. Заряженные остатки с наибольшей частотой появляются на N- и C-концах спирали и, как правило, отсутствуют в β -структурных областях. Частоты появления остатков на концах спиралей могут быть скоррелированы со значениями параметров инициации Зимма и Брэгга — σ . П. Чоу и Г. Фасман предложили механизм свертывания белковой цепи в глобулу, согласно которому спиральная нуклеация начинает зарождаться в центре фрагмента с наибольшими у остатков значениями P_α и затем распространяется в обоих направлениях вплоть до спиралеразрывающих остатков с малыми значениями P_α [99]. Аналогичным образом происходит формирование β -структурных нуклеаций. Авторы считают, что при $P_\beta > P_\alpha$ образование β -структур становится более предпочтительным по сравнению с α -спиралями. Аминокислоты были классифицированы на две группы, состоящие из шести подгрупп, начиная с сильных α (или β)-образующих остатков и кончая $\alpha(\beta)$ -разрывающими остатками.

Расположение природных аминокислот по значению P_α не отвечает обратному порядку их расположения по значениям P_β . Например, остаток Glu является хорошим образователем и α -спирали ($P_\alpha = 1,17$), и β -структуры ($P_\beta = 1,23$), а остаток Asn эффективно ослабляет обе вторичные структуры ($P_\alpha = 0,73$, $P_\beta = 0,65$). Эти данные статистической обработки весьма интересны. Они указывают на отсутствие у большинства остатков антагонизма по отношению к обоим вторичным структурам, т.е. на приблизительно одинаковую вероятность многих остатков входить как в α -спираль, так и в β -структуру. Заметим, что это свойство природных аминокислот чрезвычайно уменьшает эффективность статистического подхода к идентификации вторичных структур. На основе конформационных параметров P_α и P_β Чоу и Фасман сформулировали простые правила определения α -спиралей и β -

структур. Сегмент белка из шести остатков и более, имеющий в среднем на остаток значение $P_\alpha > 1,03$ в случае $P_\alpha > P_\beta$ и удовлетворяющий ряду граничных условий (соответствующее расположение на концах заряженных остатков, отсутствие Pro внутри и на С-конце и т.д.), определяется как α -спиральный. Сегмент белка из пяти остатков и более с $P_\beta > 1,05$ при $P_\beta > P_\alpha$ и удовлетворяющий другому ряду граничных условий, определяется как β -структурный. Предсказательный алгоритм использован авторами для выделения вторичных структур у 15 белков, нативные конформации которых явились базовыми для разработки, и у четырех других белков. В 19 рассмотренных белках (3233 остатка) в α -спирали входят 1168, а в β -структуры — 615 остатков. Для первой структуры правильно предсказаны 931, неправильно — 454; для второй — соответственно 507 и 411. Точность предсказания у разных белков неодинакова. Относительно удачны предсказания, например, для миоглобина, лизоцима, инсулина, трипсинового ингибитора; неудачны для диастазы, химотрипсина, субтилизина, цитохрома с, стафилококковой нуклеазы, конканавалина. Так, из 16 α -спиральных остатков эластазы ни один не определен правильно, но сделано 25 ошибок. В папаине в β -структуре содержится 30 остатков, из них правильно предсказаны 26, неправильно — 33. Результаты сравнения предсказанных α -спиральных и β -структурных областей с наблюдаемыми находятся в резком диссонансе с оптимистическим заключением авторов о том, что "...полученные в работе конформационные характеристики аминокислотных остатков могут обеспечить точную идентификацию вторичных структур, а также быть полезными в изучении свертывания белковой цепи в третичную структуру". [98. С. 220].

Позднее подобный подход был распространен Чоу и Фасманом на повороты цепи [100]. Статистическому анализу были подвергнуты 29 белков известной структуры, содержащих 459 β -изгибов. Образующие петли тетрапептидные фрагменты в соответствии с последовательностью значений углов ϕ, ψ у остатков в положениях $n, n+1, n+2$ и $n+3$ были разбиты на 11 классов. Из частот появления остатков в каждом из этих положений тетрапептида найдены конформационные параметры P_i . Наиболее часто в положении n встречаются остатки Asn, Cys, Asp; $n+1$ — Pro, Ser, Lys; $n+2$ — Asn, Asp, Gly; $n+3$ — Trp, Gly. Самыми высокими потенциалами вхождения во все места β -изгиба обладают Pro, Gly, Asn, Asp. Гидрофобные остатки реже, чем гидрофильные, входят в поворотные цепи, однако они более часто встречаются в непосредственной близости от них. Надежность разработанного алгоритма приблизительно такая же, как и алгоритма предсказания α -спиралей и β -структур.

А. Бэржес и соавт. [101] предприняли попытку учесть с помощью статистического анализа взаимодействия между соседними и дальними по цепи остатками, основываясь на традиционном представлении о белковой конформации, включающей α -спираль, β -структуру, β -изгиб и клубок. При разработке алгоритма предсказания этих состояний

учитывались, с одной стороны, статистические веса оптимальных форм свободных аминокислотных остатков, полученных путем теоретического анализа соответствующих метиламидов N-ацетил-L-аминокислот, а с другой — частоты появления различных конформаций остатков в восьми белках известной структуры. Новое здесь заключалось не только в большем, чем в предшествующих аналогичных разработках, количестве предсказываемых конформационных состояний, но и в одновременной, а не последовательной (предпочтительной), как это было ранее, локализации α -спиралей, β -структур и β -изгибов. В силу чисто эмпирического характера сформулированных в работе правил конформационного отбора бессмысленно рассматривать их физическое содержание и анализировать, насколько в действительности они могут передать все возможное многообразие взаимодействий основных и боковых цепей 20 типов остатков в нонапептиде. Критерием эффективности "нонапептидного" предсказательного алгоритма, как и любой эмпирической корреляции, может быть лишь практика. Сопоставим результаты предсказаний по этому алгоритму с экспериментально наблюдаемыми вторичными структурами. В лизоциме в α -спирали входят 46 остатков, 19 предсказаны правильно, 31 — неправильно; β -структура белка состоит из четырех остатков, ни один из которых не был предсказан, но сделано 12 ошибок. Другой пример — папаин. В нем 50 остатков входят в α -спирали, 13 определены правильно при 43 ошибочных предсказаниях; в β -структурах содержится 21 остаток, четыре из которых предсказаны правильно при 69 ошибочных предсказаниях. Еще менее достоверна идентификация вторичных структур в миоглобине, карбоксипептидазе, миогене, цитохроме b_5 , рубредоксине, конканавалине, также входящих в состав базовых белков.

Для количественной оценки предсказательной способности того или иного алгоритма Бэржес и соавт. ввели так называемый индекс предсказания P , который учитывает число идентифицируемых состояний [101]. Значение P может меняться от -1 до $+1$ в зависимости от значения Q , равного отношению числа правильно предсказанных состояний остатков к числу остатков в цепи. Если все предсказания неправильны, то $P = -1$; если число правильных предсказаний совпадает с числом, ожидаемым при беспорядочном отнесении состояний, то $P = 0$; если же все отнесения правильны, то $P = 1$. Значения индекса предсказания были получены для всех предложенных ранее процедур и сопоставлены с индексами P нового "нонапептидного" алгоритма. Оказалось, что его предсказательная способность не выше, а в ряде случаев ниже других алгоритмов. В частности, И. Протеро в 1966 г. более правильно предсказал α -спиральное содержание в миоглобине и лизоциме, чем Бэржес и соавт. в 1974 г. [63]. Если судить по индексу P , то процедура Котельчука и Шераги может показаться не менее предпочтительной, чем "нонапептидная" [71, 72]. Между тем в этих работах постулировалось отсутствие взаимодействий между соседними остатками и предсказательный алгоритм базировался только на учете

конформационных свойств отдельных аминокислот. Для рибонуклеазы, субтилизина, карбоксипептидазы, рубредоксина и ряда других белков индекс предсказания R близок к 0, т.е. точность предсказания "нона-пептидного" алгоритма практически отвечает случайному отнесению состояний. Таким образом, можно заключить, что подход к решению проблемы средних взаимодействий, предложенный Бэржесом и сотр., не является эффективным. Трудно согласиться с мнением авторов, что разработанный ими алгоритм может служить основой для установления связи между аминокислотной последовательностью и окончательной третичной структурой.

Любопытный эксперимент по проверке предсказательной способности различных эмпирических корреляций между первичной и вторичными структурами был проведен с аденилаткиназой. Исследователям, занимающимся разработкой предсказательных схем, были разосланы данные по аминокислотной последовательности белка с предложением определить его структурные особенности. При этом никто из них не был информирован заранее о результатах расшифровки трехмерной структуры аденилаткиназы. Полученные ответы с предсказаниями вторичной структуры белка были опубликованы вместе с экспериментальными данными [102]. Сопоставление теоретических и опытных данных, приведенных в табл. II.4, показывает, что ни один из методов определения вторичных структур не может считаться надежным.

В 1970-е годы большое внимание уделяется концепции α -спирального механизма самоорганизации белковой глобулы, первоначально предложенной Шерагой и соавт. в 1971 г. [75]. Создание третичной структуры, согласно этой концепции, начинается с образования в развернутой белковой цепи преимущественно α -спиралей, которые служат инициаторами дальнейшей сборки макромолекулы. Спирализация осуществляется за счет локальных взаимодействий. В процессе свертывания цепи взаимодействия спиралей, т.е. дальние взаимодействия, могут привести как к их дополнительной стабилизации, так и дестабилизации и разрушению.

На этой основе, предполагая, правда, сохранение спиралей, образовавшихся в начале структурирования, О.Б. Птицын и А.А. Рашин в 1973 и 1975 гг. описали самоорганизацию глобулярной конформации апомиоглобина [103, 104]. Процесс свертывания представлен несколькими последовательными стадиями. Первая стадия заключается в образовании на ряде участков цепи α -спиралей, наблюдаемых в нативной конформации белка. Спирали, как и в работе Гуццо [61], аппроксимируются жесткими цилиндрами. Далее соседние по цепи α -спирали агрегируют и образуют так называемые центры кристаллизации; последние, взаимодействуя друг с другом таким образом, что гидрофобные остатки оказываются экранированными от воды, собираются в окончательную компактную структуру. Метод не компьютеризирован и не приложим к белкам, построенным неполностью из α -спиралей. Ясно, что представление Птицына и Рашина о механизме самоорганизации белков глобулы может служить лишь

Предсказания вторичных структур аденилаткиназы [102]

Авторы предсказательных алгоритмов	Количество предсказательных остатков					
	α -Спираль		β -Структура		β -Изгиб	
	Правиль- ные	Непра- вильные	Правиль- ные	Непра- вильные	Правиль- ные	Непра- вильные
К. Барри и С. Фридман (1974 г.)	56	59	—	—	—	—
П. Чоу и Г. Фасман (1974 г.)	70	49	20	33	28	28
А.В. Финкельштейн и О.Б. Птицын (1971 г.)	79	38	13	16	—	—
Б. Робсон и Р. Пейн (1974 г.)	42	71	—	—	—	—
В.И. Лим (1974 г.)	82	52	13	16	—	—
К. Нагано (1974 г.)	61	55	22	54	38	35
Д. Котельчук и Г. Шерага (1968 г.)	41	98	—	—	—	—
П. Льюис и Г. Шерага (1970 г.)	46	78	—	—	—	—
П. Льюис и Г. Шерага (1971 г.)	—	—	—	—	33	27
А. Бэржес и соавт. (1974 г.)	21	87	—	—	—	—

качественной иллюстрацией правдоподобного пути самосборки высоко-спиральных белков при обязательном условии, что их трехмерные структуры уже известны. Сказанное справедливо и для серии более поздних аналогичных исследований Ф. Коэна и М. Стернберга (1979—1983 гг.).

В.И. Лим и соавт. в ряде работ [105—109] в рамках α -спиральной концепции также придерживаются мнения о том, что спиральное содержание трехмерной структуры нативного белка составляет лишь часть спиралей, предшествовавших на первой стадии свертывания цепи. Главным узловым моментом трактовки механизма формирования пространственного строения белка является предположение о почти сплошном свертывании в начале процесса полипептидной цепи в α -спирали (они названы s-спиралями), которые в дальнейшем служат блоками для образования высокоспиральной промежуточной структуры. Эта структура имеет такую же, как у нативной конформации, топологию белковой цепи. Переход от промежуточного к конечному состоянию представлен простым растяжением некоторых из s-спиралей. Предполагается, что по локальным взаимодействиям s-спираль является самой компактной, стабильной и наиболее быстро формируемой

структурой. Оптимальной для построения высокоспиральной промежуточной структуры считается α -спираль из 10—15 остатков. В.И. Лим и соавт. полагают, что именно такая длина отвечает наиболее часто встречающимся в нативных конформациях белков α -спиралям. Это не совсем так. Согласно статистике Чоу и Фасмана по 19 белкам, чаще встречаются короткие спирали из 4—9 остатков (в 38 случаях из 99); спирали же из 10—15 остатков обнаружены в 34 случаях [99]. К такой же картине приводит анализ Р. Сринивансана 23 белков: α -спиральные сегменты из 4—9 остатков составляют 44% α -спирального содержания учтенных белков, а из 10—15 остатков — 38% [110].

Для идентификации спиральных участков в развернутой цепи и их последующей укладки в окончательную структуру Лим и соавторы сформулировали ряд стереохимических правил, выведенных из качественного рассмотрения атомных моделей и интуитивных соображений. На основе таких правил предсказаны пространственные формы полипептидных цепей четырех белков, трехмерные структуры которых известны. Приведем сопоставление экспериментальных и теоретических данных, касающихся содержания регулярных структур в карбоксипептидазе. В белке содержится 113 спиральных остатков, из которых правильно предсказаны 75 при 40 ошибках; в β -структуры входят 45 остатков, правильно определены 42, неправильно — 21; конформационные состояния остальных остатков не идентифицированы. Подобная точность предсказания имеет место и в других случаях.

В работах Финкельштейна и Птицына [111—115] рассчитаны по способу Льюиса и Шераги [74] вероятности спирального состояния для аминокислотных остатков развернутых цепей белков известной структуры. Для 35 белков, в нативном состоянии которых наблюдаются 160 α -спиральных сегментов, предсказано с помощью s и σ параметров Зимма и Брэгга приблизительно вдвое большее число спиральных участков. Например, в денатурированном α -химотрипсине, согласно Финкельштейну и Птицыну, в α -спирали входят 105 остатков, а в нативном белке их не более 20. Предположено также, что при свертывании белковой цепи большая часть спиралей переходит в β -структуры и различные нерегулярные формы. Представление об α -спиральном механизме самосборки белков является чисто гипотетическим. Оно не подтверждено количественным анализом и не опирается на эксперимент, который можно было бы трактовать однозначным образом. Например, в качестве подтверждения А.В. Финкельштейн и Ю.Б. Птицын ссылаются на работу А. Куммингса и Е. Эйринга [116] по кинетике перехода спираль—клубок поли- L -глутаминовой кислоты, в которой приведена константа скорости образования спирали $6 \cdot 10^7 \text{ с}^{-1}$, и на работу Р. Цана [117], где значение этой константы ($\sim 10^8 \text{ с}^{-1}$) оценено по времени релаксации вращения вокруг связей поливинилового цепи. Неясно, однако, почему данные по поли- L -глутаминовой кислоте и поливинилового цепи могут служить обоснованием того, что почти в любой части гетерогенной аминокислотной последовательности α -

спираль непременно должна являться самой предпочтительной и наиболее быстро свертываемой структурой. Известно, что гомополипептиды природных аминокислот реализуются в растворе не только в α -спиральной, но и в других регулярных формах при постоянном наличии клубкового состояния, т.е. огромного числа нерегулярных флуктуирующих конформаций. При незначительных изменениях внешних условий равновесие может быть смещено в любую из этих форм. Следовательно, у гомополипептидов α -спираль по своей стабильности отнюдь не является исключительной структурой.

Выше отмечалось, что Птицын, Лим, Финкельштейн и другие считают ближние взаимодействия ответственными за образование α -спиралей в развернутой белковой цепи. В связи с этим большой интерес представляют структурные исследования олигопептидов, у которых условия формообразования наиболее близки начальной стадии ренатурации белка. Согласно данным Гудмана и соавт. [118], регулярная форма, например, олигомерного изолейцина, четко обнаруживается начиная с декапептида, причем она является не α -спиралью, а β -структурой. Между тем Лим и соавт. [107—109] относят именно изолейцин к наиболее сильным α -спиралеобразующим остаткам. Олигопептид глутаминовой кислоты, которая не фигурирует в качестве α -спиралеобразующего остатка, напротив, по данным Гудмана, реализуется, начиная с гептамера, в α -спиральной конформации [119]. Р. Эпанд и Г. Шерага [120], Р. Сингхол и М. Атасси [121], а также Дж. Харелл и соавт. [122] показали значительное уменьшение спирального содержания у белковых фрагментов, отделенных от основной цепи и лишенных тем самым дальних взаимодействий. Согласно Лиму и соавторам, эффект должен быть обратным. Еще в 1935 г. У. Астбери и С. Дикинсон при рентгеноструктурном исследовании ряда глобулярных белков в денатурированном состоянии не обнаружили признаков α -формы; полученные ими дифракционные картины однозначно свидетельствовали о наличии, наряду с аморфной частью, вытянутой β -формы, такой же, как в фиброине шелка [123, 124].

Наконец, рассматривая распространенное предположение, что α -спираль у гетерогенной аминокислотной последовательности представляет собой самую компактную структуру, нужно отметить, что в данном случае наибольшей плотностью должны были бы обладать высокоспирализованные белки. Однако это не так. Например, плотность миоглобина и гемоглобина (1,35 и 1,34 г/см³ соответственно), состоящих на 75% из α -спиралей, оказывается даже несколько меньше плотности карбоксипептидазы, химотрипсина, рибонуклеазы и стафилококковой нуклеазы (1,39, 1,37, 1,41 и 1,39 г/см³ соответственно), имеющих незначительное содержание α -спиралей, которые к тому же очень искажены [125—129]. Отсутствие корреляции между спиральным содержанием и плотностью белка следует и из сопоставления значений плотности, полученных Козманом и соавт. [130] из расчета на основе известных координат атомов трехмерных структур.

Спиральная концепция самосборки и гипотеза о предсуществовании спиралей в денатурированном белке не следуют из каких-либо

физических соображений общего порядка. Их основой служат лишь результаты предсказания спирального содержания, надежность которого невелика. Можно, однако, понять привлекательность для исследователей, занимающихся разработкой алгоритмов предсказания вторичных структур, предположения о предсуществовании α -спиралей, так как оно в определенной степени примиряет традиционное, лежащее в основе всех поисков эмпирических корреляций представление о белковой структуре как о наборе регулярных вторичных структур с реальными нативными конформациями глобулярных белков, у которых во многих случаях регулярные участки незначительны или вообще отсутствуют [131—133].

Ф. Максфилд и Г. Шерага предприняли в 1976 г. еще одну попытку разработать алгоритм предсказания, который мог бы дать ограниченный набор начальных конформаций белковой цепи, а минимизация последних привела бы к правильной трехмерной структуре макромолекулы [134]. Новый алгоритм, выведенный из статистического анализа 20 белков известной структуры, позволяет предсказывать для каждого остатка пять конформационных состояний в областях правой α -спирали, β -структуры, левой α -спирали и двух промежуточных областях. В нем учитываются внутриостаточные взаимодействия, а также (косвенным образом) парные взаимодействия данного остатка с четырьмя предшествующими остатками. Средняя точность разработанного алгоритма, по оценке самих авторов, составила всего 56%. Следовательно, около половины остатков в белковой последовательности предсказываются неправильно. Ф. Максфилд и Г. Шерага заключают, что хотя предложенный ими метод идентификации конформационных состояний среди всех существующих предсказательных алгоритмов является наиболее точным, но и он не обеспечивает выхода к структуре, которая могла бы послужить исходной для последующего уточнения.

С такой оценкой согласуются данные Робсона и соавт. [135], проанализировавших надежность различных алгоритмов предсказания вторичных структур на 26 белках известного пространственного строения. Авторы пришли к выводу, что точность отнесения остатков к четырем конформационным состояниям (α -спираль, β -структура, β -изгиб и клубок) не превышает 49%. Приблизительно такую же точность (50%) имеют как старый метод [94], так и новый метод Нагано [136, 137], усовершенствованный включением корреляции между тремя остатками в спиральных областях, выведенной из анализа 36 белков.

Исследование Максфилда и Шераги (последний интенсивно занимается поисками эмпирических корреляций, начиная с 1960 г.) примечательно не столько разработкой еще одного предсказательного алгоритма, сколько своим общим заключением о возможностях статистического подхода в отношении надежности предсказания и понимания принципов пространственной организации белковой молекулы. Так, авторы пишут: "Поскольку любой метод, использующий данные о белках известной структуры, будет сталкиваться с

теми же статистическими ограничениями, то, по-видимому, невероятно, чтобы изменения в методе, использующем такие данные, привели к значительному увеличению точности, пока количество данных не возрастет" и далее: "...очевидно, имеющиеся предсказательные методы являются бесполезными для понимания структуры белков" [134. С. 5150]. С этим трудно не согласиться. Однако всего через год в работе Г. Немети и Г. Шераги [138] высказывается мнение, противоречащее только что процитированному, а также заключению, сделанному Бэржесом и Шерагой [139]. Обсуждая параметры, полученные из статистических предсказательных алгоритмов, Г. Немети и Г. Шерага пишут: "Приложение этих параметров к белкам с известными аминокислотными последовательностями дает вероятные конформационные состояния, которые могут быть использованы в качестве исходных для минимизации энергии" [138. С. 242]. Аналогично высказывание в другом месте этой же работы: "...предсказательные схемы являются очень полезными как первый шаг в расчете конформационной энергии" [138. С. 340]. К сожалению, Немети и Шерага не поясняют, каким образом можно получить пригодную для уточнения белковую структуру, если даже один из самых точных алгоритмов — алгоритм Максфилда и Шераги [134] — предсказывает неправильно конформационные состояния у половины остатков, причем в случае белка, не исследованного рентгеноструктурно, неизвестно, какой именно половины.

Имеющийся в литературе материал и прежде всего многочисленные результаты одного из авторов убеждают в обратном. Ранее Бэржес и Шерага показали, что даже в гипотетическом случае — при наличии совершенного алгоритма, правильно предсказывающего для всех остатков белковой последовательности области их конформационных состояний, — задача получения структуры белка, напоминающей нативную конформацию, остается тем не менее нерешенной [139].

8.2. ТОЧНОСТЬ ПРЕДСКАЗАНИЯ ВТОРИЧНЫХ СТРУКТУР

В конце 1970-х годов было проведено много исследований, посвященных различным аспектам корреляционного подхода к предсказанию вторичной структуры по аминокислотной последовательности. Однако они не внесли принципиально нового в решение обсуждаемой проблемы. Не претерпела серьезных изменений и надежность предсказательных алгоритмов, как предложенных вновь, так и сделанных ранее, модифицированных и опирающихся на значительно больший экспериментальный материал [140—157]. В этой связи интересны данные сопоставления конформационных параметров П. Чоу и Г. Фасмана [99] с параметрами, полученными таким же образом М. Левиттом из анализа приблизительно вдвое большего количества белков [153]. Исследователи обнаружили значительное различие в распределении остатков в двух наборах по их способностям образовывать и разрушать вторичные структуры. С помощью парамет-

ров Чоу и Фасмана и параметров Левитта были предсказаны α -спирали и β -структуры в четырех белках и оценены коэффициенты правильности предсказания (C). Использование первого набора привело к значениям $C = 0,26$ для α -спирали и $C = 0,29$ для β -структуры, а второго набора — соответственно 0,22 и 0,10 ($C = 1,0$ при совершенном предсказании и $C = 0$ при беспорядочном). Обращает внимание низкая достоверность результатов в обоих случаях. Таким образом, точность предсказания не возрастает от того, подвергаются ли статистической обработке сотни или тысячи остатков в белках известной структуры.

В ряде работ второй половины 1970-х и начала 1980-х годов (например, [151, 157]) для предсказания вторичных структур одновременно привлекаются все имеющиеся алгоритмы и выводы делаются на основе усредненных результатов. Однако такая процедура не может повысить достоверность предсказания, точно так же как не может возрасти, например, точность измерений при использовании не одного, а нескольких приборов, каждый из которых не удовлетворяет требуемым условиям.

Оценка точности эмпирических предсказаний вторичных структур по аминокислотным последовательностям представляет собой непростую задачу. Многие авторы корреляционных методов в этом вопросе оказываются недостаточно объективными. Так, опробирование методов часто проводится на базовом наборе белков, что, очевидно, имеет огромное значение. При использовании многих правил и большого числа эмпирических параметров для ограниченного круга объектов можно получить удовлетворительное соответствие, которое, однако, не будет отражать реальную предсказательную ценность метода. Иллюстрацией сказанному служит табл. II.4, содержащая результаты различных методов предсказания вторичной структуры аденилаткиназы, о пространственном строении которой авторы не были информированы. В результате приблизительно в половине отнесенный число ошибок превышает число правильных предсказаний в 1,5—4,0 раза.

Известно семь способов количественной оценки результативности предсказаний — показатели качества (Q_1 — Q_7), отражающих различные стороны предлагаемых методов [157]. При отнесении остатка к одной из вторичных структур возможны следующие четыре случая: положительное (w) и отрицательное (x) правильные предсказания, недопредсказание (y) и сверхпредсказание (z). Общепринятый среди создателей алгоритмов предсказания критерий качества Q_3 равен сумме долей положительных и отрицательных правильных предсказаний вторичных структур ($w + x$). Именно таким образом оценивали свои методы Котельчук и Шерага [71, 72], Льюис и Шерага [74, 75], Робсон и Пейн [89 – 91]. Нагано [94], Чоу и Фасман [98, 99] и др. Использование Q_3 не вызвало бы возражения, если бы α -спирали, β -структуры и β -изгибы входили в белковые третичные структуры приблизительно в равных долях и оценка показателей качества предсказания всех видов вторичных структур делалась бы не последовательно, а одновременно.

В действительности же это не так. Известно, что среднее содержание спиралей в белках (не учитывая мембранных) не превышает 35%, по новейшей статистике, оно меньше 30%. Поэтому при идентификации спиралей вероятность отрицательного правильного предсказания в 2—3 раза выше вероятности положительного правильного предсказания. Еще больший вклад в показатель качества Q_3 вносят отрицательные правильные предсказания β -структуры, среднее содержание которой в белках составляет 15—20%. Таким образом, наиболее распространенный способ оценки качества приводит к завышенным значениям Q_3 и, следовательно, к переоценке эффективности корреляционных методов.

Насколько может быть далеким от реальности представление о возможностях алгоритмов предсказания, которое, вероятно, при некритическом отношении к такому показателю качества, как Q_3 , Г. Шульц и Р. Ширмер иллюстрируют двумя типичными примерами идентификации вторичных структур [157]. В первом примере для белка с незначительным α -спиральным содержанием не было сделано ни одного положительного правильного предсказания ($w = 0$) при сравнительно большой доле, что почти неизбежно в данном случае, отрицательных правильных предсказаний (например, $x = 0,7$). При таком, казалось бы, плачевном для использованного алгоритма результате (по существу, не получено никакой информации о структуре белка) количественная оценка его эффективности по значению Q_3 получается тем не менее вполне удовлетворительной (70% достоверных предсказаний). Если же при этом сделано даже небольшое число положительных правильных предсказаний (например, $W = 0,1$), то показатель качества Q_3 возрастает до 80%, что уже близко к оптимальному соответствию теории и эксперимента.

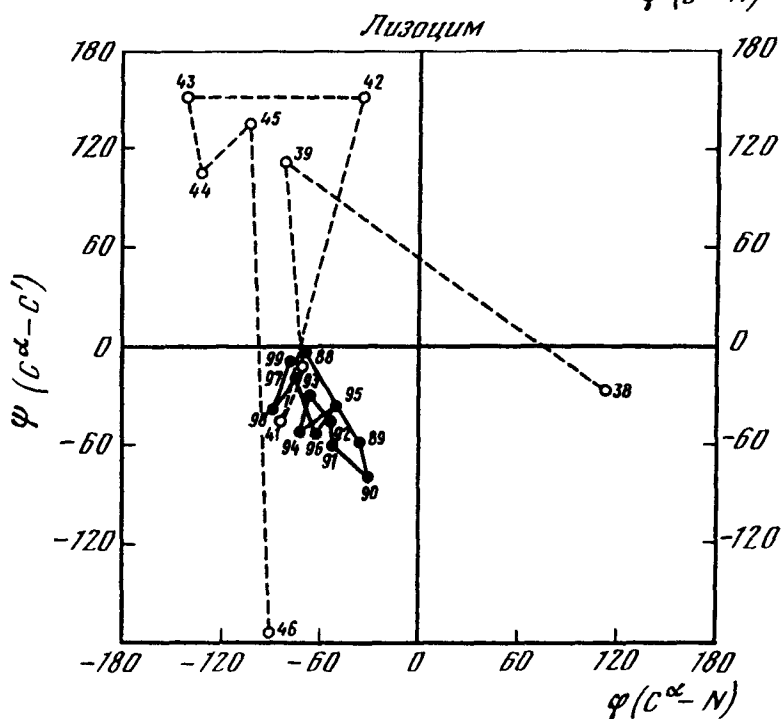
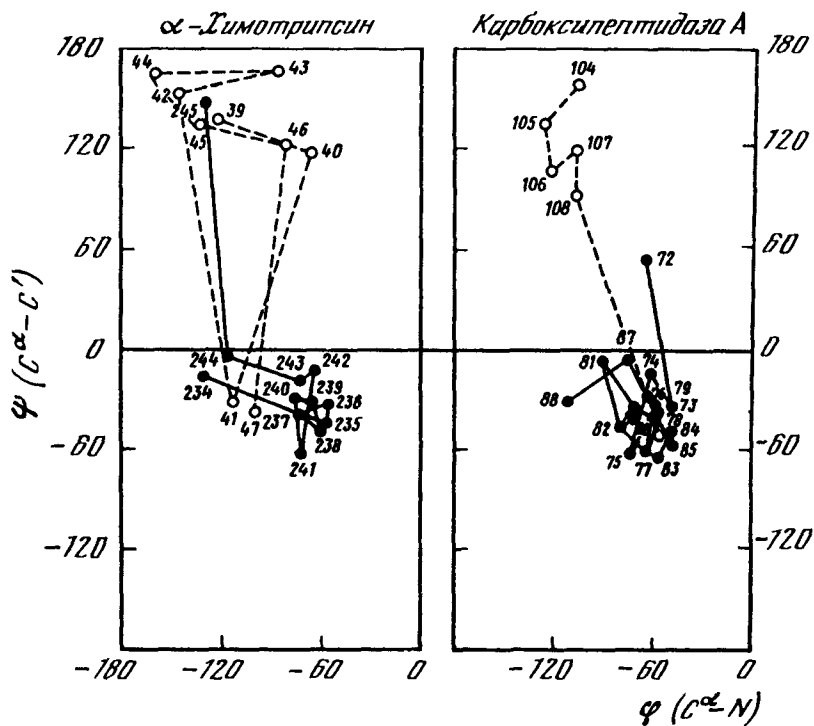
Более объективен показатель надежности эмпирических корреляций Q_7 , предложенный Б. Мэтьюзом [158]. Он рассчитывается по средневзвешенным значениям w, x, y, z , т.е. в нем учитываются также недопредсказания и сверхпредсказания. В выше отмеченном первом примере его значение составляет $-0,17$, а во втором $+0,38$ при максимальных изменениях от $-1,0$ (в случае полностью неправильных предсказаний $w = x = 0$) до $+1,0$ ($w = x = 1, y = z = 0$). Таким образом, в первом примере предсказание хуже, чем среднестатистическое, беспорядочное, а во втором — несколько лучше. Значения критерия Мэтьюза для сегментов α -спиралей, β -структур и β -изгибов аденилаткиназы, рассчитанные по лучшим из имеющихся для этого белка предсказаниям, равны соответственно 0,56, 0,58 и 0,60, а для лизоцима T_4 — 0,42, 0,28 и 0,20 [157].

Несмотря на отсутствие заметного прогресса и разочаровывающие результаты предсказаний, стремление решить проблему пространственной организации глобулярных белков на основе эмпирического подхода (т.е. простейшим образом) не ослабевает и в 1980-е годы. Однако в последний период работы этого плана, оставаясь на тех же идейных позициях, приобретают большее разнообразие. Остановимся на новых по своему характеру исследованиях, которые специально посвящены

идентификации вторичных структур в нативных конформациях белков и оценке эффективности методов их предсказания. Вопрос о выделении в кристаллографических структурах глобулярных белков регулярных вторичных структур — α -спиралей и β -складчатых листов — является одним из самых актуальных для корреляционного подхода. В течение многих лет это делалось в значительной мере произвольно, без использования количественных критериев. Необходимость в них, очевидно, вообще бы не ощущалась, если бы в нативных конформациях белков вторичные структуры были действительно регулярными.

Насколько геометрические параметры реальных конформационных состояний полипептидной цепи отличаются от параметров так называемых вторичных структур, можно судить по рис. II.3, на котором показано распределение на конформационных картах ϕ — ψ остатков некоторых сегментов цепей α -химотрипсина, карбоксипептидазы А и лизоцима [61]. Во всех исследованиях, посвященных поиску эмпирических корреляций, эти сегменты отнесены к α -спиральным или β -структурным. Из рис. II.3 видно, что в экспериментально наблюдаемых конформационных состояниях остатков, включенных при статистической обработке во вторичные структуры, значения двугранных углов ϕ , ψ не только не выражаются в точки (ϕ_α , ψ_α) и (ϕ_β , ψ_β), что должно иметь место при строгой регулярности структур, а обнаруживают существенный разброс в пределах α - и β -областей. Более того, в ряде случаев значения ϕ , ψ остатков α - и β -сегментов вообще находятся в совершенно других местах конформационной карты. Если ограничить отклонения α -спиральных углов ϕ , ψ от стандартных значений, например $\pm 15^\circ$, то в трех приведенных примерах в α -спиральных сегментах окажется не 41 остаток, а лишь 18; что же касается β -структуры, то при таком ограничении углов ϕ , ψ в нее не попадет больше двух остатков. Если же исключить из структур, считающихся вторичными, по три остатка с их N- и C-концов, которые, как правило, имеют большие отклонения по углам ϕ , ψ или отвечают другим конформационным состояниям, то содержание в глобулярных белках участков, действительно близких к регулярным, уменьшится по сравнению с принятыми в литературе в 2—3 раза. При введении количественного критерия регулярности нельзя уже будет считать вторичными структурами большинство коротких α -спиралей и β -структур, в том числе и большинство спиралей из 4—9 остатков, которые являются самыми распространенными в белках. В связи с тем, что в реальных белках вторичные структуры не обладают правильными регулярными формами, их идентификация субъективна и существенно отличается у разных авторов. Например, в лизоциме Чоу и Фасман [99] к α -спиралям и β -структурам относят соответственно 54 и 21 остаток, а Бэржес и соавт. [101] — 46 и 4; в субтилине BPN' (отнесения [101] даны в скобках) — 86 (69) и 27 (44), в папаине — 54 (50) и 30 (21). Подобных примеров можно привести очень много.

Создание количественных методов компьютерного определения вторичных структур в наблюдаемых трехмерных структурах белков необходимо также вследствие усложнения методов корреляционного



анализа, увеличения количества рентгеноструктурно исследованных белков и некоторых других причин, в частности из-за неоднозначности результатов предсказания того или иного метода при использовании его не авторами, а другими исследователями. Первые алгоритмы идентификации β -изгибов с помощью ЭВМ по экспериментальным данным были созданы И. Кунтцем [159, 160] и П. Льюисом и Г. Шерагой [78]. Позднее они усовершенствовались П. Чоу и Г. Фасманом [100], Г. Раузе и Дж. Селтцером [150]. С. Лифсон и Х. Сандер [161] разработали компьютерный метод установления β -структуры, а М. Левитт и Дж. Грир [146] создали первый алгоритм автоматического определения α -спиралей, β -структур и β -изгибов по известным координатам атомов C^α . Еще большей универсальностью обладает алгоритм У. Кэбша и Х. Сандера, в основу которого положены геометрические особенности вторичных структур и системы их водородных связей [162]. α -Спирали и β -складчатые листы описываются повторением элементарных водородносвязанных моделей изгиба (в первом случае) и мостика (во втором). Алгоритм позволяет также определять доступность остатков пространственной структуры белка для молекул воды (по числу их возможных контактов). Программа Кэбша и Сандера была использована для идентификации в известных трехмерных структурах 62 белков трех типов конформационных состояний. Согласно полученным данным из 10763 составляющих эти белки остатков 3047 (28%) входят в α -спирали, 2295 (21%) — в β -структуры и 5421 (51%) — в β -изгибы и другие нерегулярные формы пептидной цепи. Считая свое отнесение полностью объективным, авторы проверили на нем предсказательные возможности трех широко распространенных корреляционных методов, а именно методов Чоу и Фасмана [98—100], Робсона [163] и Лима [95, 96], предварительно автоматизировав всю процедуру предсказания вторичных структур, сопоставление с экспериментальным отнесением и расчет показателей достоверности. Точность предсказания рассчитывалась как отношение числа остатков, правильно предсказанных, к общему числу остатков, предсказанных для этого же конформационного состояния. Оказалось, что показатель качества метода Чоу и Фасмана равен 50%, а методов Робсона и Лима — 56%. Следовательно, около половины остатков, входящих в α -спираль и β -структуру, предсказываются такими методами неправильно.

Значения показателей качества, полученные У. Кэбшем и Х. Сандером для трех методов из анализа 62 белков, хорошо согласуются с аналогичными оценками тех же методов Б. Бусетта и М. Хоспитала [164] по 38 белкам (47% у метода П. Чоу и Г. Фасмана, 57% — Б. Робсона и 56% — В.И. Лима), а также с оценками Дж. Ленстры [97] по 33 белкам методов К. Нагано, В.И. Лима, С. Танаки и Г. Шераги,

Р и с. II.3. Распределение в координатах $\phi(C^\alpha-N) - \psi(C^\alpha-C')$ некоторых остатков α -химотрипсина, карбоксипептидазы А и лизоцима, относимых в литературе к α -спиральным (сплошная линия) и β -структурным (пунктирная линия) участкам белковой цепи

П. Аргоса и соавторов. Воспользовавшись для характеристики алгоритмов показателем качества Мэтьюза (Q_7), Ленстра показала, что достоверность предсказаний всех методов как α -спиралей, так и β -структур и β -изгибов колеблется от 0 до 50%, поднимаясь в ряде случаев несколько выше, но чаще опускаясь ниже уровня беспорядочных отнесений.

Обстоятельный анализ предсказательных возможностей корреляционного подхода был проведен К. Нишикавой [165], который в качестве примера также рассмотрел уже упоминавшиеся три алгоритма. Оценка методов Чоу и Фасмана и Робсона проведена по 9, а метода Лима — по 11 белкам, не входившим в состав базовых наборов. При идентификации трех состояний (α -спираль, β -структура, клубок) точность определялась по показателю качества Q_3 , дающего как отмечалось, сильно завышенные значения, а при идентификации четырех состояний (α -спираль, β -структура, β -изгиб, клубок) использовался показатель Q_4 , занижающий вклад отрицательного предсказания и более реально отражающий действительные возможности методов. При переводе эмпирических правил на язык ЭВМ, т.е. при компьютеризации методов предсказания, Нишикава столкнулся с большими трудностями. Так, в случае метода Чоу и Фасмана были обнаружены неопределенности при индивидуальном предсказании вторичных структур, несогласованность предсказаний β -изгибов с предсказаниями α -спиралей и β -структур, отсутствие эффективного критерия для разделения перекрывающих предсказанных α -спиральных и β -структурных областей. Помимо этого, оказалось невозможным воспроизвести на ЭВМ результаты, полученные первоначально Чоу и Фасманом для 25 базовых белков. Преодолев эти трудности, Нишикава показал, что предсказательные возможности трех проанализированных им методов находятся на почти одном и том же, довольно низком уровне; рассчитанные Нишикавой показатели качества Q_3 попали в интервал 50—53%, а Q_4 — 40—42%. Точность предсказаний, естественно, несколько не повышается при одновременном использовании нескольких методов.

В результате обращения к количественным оценкам эффективности предсказательных алгоритмов стала очевидной их малая достоверность. Примечательно, что при использовании более объективных оценочных характеристик точности и апробации эмпирических корреляций на большом экспериментальном материале низкий уровень предсказания был обнаружен у всех существующих методов. Это обстоятельство важно, поскольку поиски эмпирических корреляций велись в различных направлениях и отличались друг от друга в отношении объема и характера привлекавшихся опытных данных, методов их обработки, числа предсказываемых конформационных состояний остатков, трактовки факторов, ответственных за стабильность вторичной и третичной структур, и т.д. В таких условиях трудно объяснить низкие показатели качества во всех случаях методологическими особенностями используемого подхода.

Напрашивается мысль об общей для всех методов причине их

низкого качества, имеющей принципиальный характер. Между тем основа самого корреляционного подхода к предсказанию вторичной структуры по аминокислотной последовательности — конформационная модель глобулярных белков Полинга и Кори не подвергается сомнению. Но если представления Полинга и Кори были вполне оправданы, так как они обобщали и объясняли наблюдаемые факты, предсказывали новые и прямо не противоречили известным в то время данным, то отстаивание тех же взглядов в 1980-е годы, когда ситуация существенно изменилась, трудно понять. За прошедшие десятилетия стали известны трехмерные структуры многих сотен белков, среди которых большинство состоит в основном из нерегулярных участков, а целый ряд белков вообще их не содержит (тРНК-синтетаза, ферродоксин, фосфолипаза, агглютинин и др.). Вторичные структуры, все-таки входящие в белки, как правило, сильно искажены и лишь условно могут быть отнесены к регулярным. В среднем, как известно, менее 50% аминокислотных остатков оказываются включенными во вторичные, условно регулярные структуры. Также не отвечают известным фактам утверждения о доминирующей роли водородных связей в стабилизации α -спиралей и β -структур и предположение о слабом взаимодействии белковых цепей друг с другом и с пептидным остовом.

В правой части табл. II.5 приведены результаты статистической обработки Дж. Рихардсон и Д. Рихардсоном 215 α -спиралей в 45 белках с большим содержанием вторичной структуры [166, 167]. Они характеризуют встречаемость стандартных аминокислот на трех участках α -спиралей (N- и C-пептидных концах и промежуточной, центральной части) и на двух трипептидных участках, непосредственно предшествующих спиралью и следующих за ними. В левой части табл. II.5 указано процентное содержание аминокислотных остатков в 215 спиральях (А), 45 базовых белках (В) и белках позвоночных (С) [168, 169]. Здесь же даны отношения А/В и А/С, отражающие склонность остатков образовывать вторичную структуру. При отсутствии такой тенденции они равны 1. Величины, превышающие 1, свидетельствуют о предпочтительности соответствующих остатков встраиваться в α -спирали, а величины меньше 1 — избегать их. Учитывая специальный отбор базовых белков, можно было ожидать, что отношение А/В окажется особенно чувствительным к проявлению этой тенденции.

Полученные значения А/В обнаруживают незначительные отклонения от 1 ($\pm 0,3$). Следовательно, даже в белках с большим содержанием α -спиралей относительное распределение остатков на упорядоченных и неупорядоченных участках близко к случайному. Как видно из табл. II.5, оно фактически является таким же и вдоль спиральных последовательностей, а также на иницирующих и разрушающих спирали участках. Лишь остаток Pro склонен, по известной причине, избегать центральные и C-концевые части спиралей, легко встраиваясь в их N-концевые части и смежные фрагменты. Столь же незначительные отклонения от 1 обнаруживают значения А/С, что указывает на близость распределения аминокислотных остатков в α -спиральях к естественному распределению.

Встречаемость аминокислотных остатков в α -спиралях кристаллографических структур 45 белков

Остаток	Относительное содержание остатков, %			Соотношение содержания остатков		Встречаемость остатков в α-спиралях и трипептидных предшествующих и последующих участках					
	В α-спиралях 45 белков (А)	В 45 белках (В)	В белках позвоночных (С)	А/В	А/С	Предшествующий трипептид	α-Спираль			Последующий трипептид	Общее число остатков
							N-Конец C ₁ ^α - C ₅ ^α	Средняя часть C ₆ ^α - C ₁₊₆ ^α	C-Конец C ₁₊₆ ^α - C ₁₊₁₁ ^α		
His	2,6	2,1	2,2	1,2	1,2	14	18	14	42	15	103
Trp	1,5	1,3	1,3	1,1	1,1	6	24	14	9	8	61
Tyr	2,9	3,4	3,2	0,8	0,9	22	30	19	30	15	116
Phe	4,0	3,8	4,1	1,0	1,0	20	36	34	51	14	155
Ser	6,3	6,9	7,0	0,9	0,9	73	47	27	67	32	246
Thr	5,2	6,1	5,6	0,8	0,9	35	45	43	44	39	206
Asn	4,7	4,5	4,1	1,0	1,1	54	30	28	37	36	185
Asp	6,5	6,0	5,4	1,1	1,2	54	81	38	32	43	248
Lys	8,2	6,7	6,5	1,2	1,2	40	67	49	111	51	318
Ile	4,7	5,1	5,0	0,9	0,9	25	40	41	50	26	182
Val	6,2	7,1	6,8	0,9	0,9	26	72	56	60	26	240

Т а б л и ц а II.5 (окончание)

Остаток	Относительное содержание остатков, %			Соотношение содержания остатков		Встречаемость остатков в α-спиралях и трипептидных предшествующих и последующих участках					
	В α-спиралях 45 белков (А)	В 45 белках (В)	В белках позвоночных (С)	А/В	А/С	Предшествующий трипептид	α-Спираль			Последующий трипептид	Общее число остатков
							Н-Конец C ₁ ^α —C ₅ ^α	Средняя часть C ₆ ^α —C ₁₊₆ ^α	С-Конец C ₁₊₆ ^α —C ₁₊₁₁ ^α		
Leu	7.8	7.7	8.7	1.0	0.9	38	82	63	87	33	303
Gln	4.3	3.6	3.9	1.2	1.1	17	40	30	44	25	156
Glu	6.0	5.6	6.8	1.1	0.9	24	105	30	65	21	245
Cys	1.8	2.4	2.5	0.7	0.7	10	24	11	18	8	71
Gly	7.4	8.7	7.6	0.8	1.0	87	48	29	23	108	290
Ala	10.4	9.0	7.2	1.1	1.4	39	114	106	105	45	404
Arg	3.0	3.8	4.9	0.8	0.6	10	34	33	41	26	144
Met	2.2	1.8	2.3	1.2	1.0	11	20	18	29	6	84
Pro	2.9	4.5	4.9	0.6	0.6	23	37	10	4	37	111
Всего	—	—	—	—	—	628	994	693	949	609	3871

Таким образом, α -спирали образуются в трехмерных структурах белков не благодаря наличию у аминокислотных остатков индивидуальной склонности к данной вторичной структуре (данные табл. II.5 свидетельствуют о практически индифферентном отношении 19 стандартных аминокислот к α -спиралям), а за счет кооперативного эффекта, возникающего лишь у уникальных последовательностей. Решающая роль принадлежит не отдельным остаткам, а их сочетаниям. Количество последних огромно, и поэтому предсказать их эмпирическим путем не представляется возможным.

Нет сомнения, что вывод о способности всех аминокислот входить в α -спиральные фрагменты белковой цепи в той же мере, если не в большей, справедлив в отношении β -структуры. На отсутствие у аминокислот избирательности к двум альтернативным вторичным структурам указывают также результаты анализа Кэбша и Сандера 62 белков (~10000 остатков), трехмерные структуры которых известны [170, 171]. В исследованных белках были, в частности, обнаружены 25 пентапептидных фрагментов, идентичных по химическому строению, но существенно отличающихся по пространственной структуре. Те же самые пять аминокислотных остатков у одних белков входят в α -спирали, у других образуют β -складчатые листы, а у третьих составляют различные нерегулярные участки.

Подобные примеры не единичны. Так, гексапептидный фрагмент Val—Glu—Leu—Ile—Arg—Gly в структуре нейраминидазы [172] имеет α -спиральную конформацию, а белка вируса табачной мозаики [173] — β -структурную. В различных состояниях (α -спираль и β -складчатый лист) у фосфофруктокиназы [174] и термолизина [175] находится еще одна гексапептидная последовательность — Asn—Ala—Ala—Ile—Arg—Ser (другие примеры см. [177, 178]).

Дж. Лещинский и Г. Раузе [179] возвели в ранг вторичной структуры новое нерегулярное пространственное образование белковой цепи, названное ими Ω -петлями. Это стало вторым отступлением от данного Полингом и Кори определения вторичной структуры как регулярной, геометрически идентифицированной формы основной цепи на локальном участке аминокислотной последовательности [1, 2]. Первое отступление от классического понятия было сделано Льюисом и Шерагой, которые ввели в категорию вторичной структуры так называемые β -изгибы, также не имеющие регулярной формы и определенной геометрии [75]. Отнесение β -изгибов и Ω -петель к вторичным структурам не согласуется и с классификацией белковых структур Линдерстрем-Ланга на первичную, вторичную и третичную [3]. Если к вторичным структурам относить регулярные и нерегулярные участки основной цепи, теряется смысл в самом этом понятии и, следовательно, в классификации Линдерстрем-Ланга.

Дж. Лещинский и Г. Раузе [179] проанализировали 67 белков известной структуры, обладающих 270 Ω -петлями, т.е. в среднем более четырех на один белок. К Ω -петлям авторы отнесли полностью нерегулярные и лишенные β -изгибов участки белковой цепи протяженностью от 6 до 16 остатков и с расстоянием между N- и C-концами от 3,7 до

Коэффициенты встречаемости (f) аминокислотных остатков в Ω -петлях трехмерных структур белков [178]

Остаток	f	Остаток	f	Остаток	f	Остаток	f
Gly	1,3	Ser	1,2	Gln	0,9	Ala	0,8
Pro	1,3	Cys	1,1	Arg	0,9	Leu	0,8
Tyr	1,3	Glu	1,1	Phe	0,9	Ile	0,7
Asp	1,2	Thr	1,1	Trp	0,9	Met	0,7
Asn	1,2	Lys	1,0	His	0,8	Val	0,6

Примечание. $f = \frac{x_1 / x_t}{n_1 / n_t}$. x_1 — количество остатков типа x в Ω -петлях; x_t — общее количество остатков типа x в белках; n_1 — количество остатков в Ω -петлях; n_t — количество остатков в белках.

10,0 Å. По самым скромным подсчетам удовлетворяющие таким требованиям структуры могут принимать от 3^5 до 3^9 различных форм основной цепи. Поэтому их предсказание на основе эмпирического подхода исключено. К этой же мысли подводит и недавно опубликованная работа С. Кинга и соавт. [180], в которой предпринята попытка классифицировать встречающиеся в белках Ω -петли. Результаты анализа Ω -петель, проведенного Лещинским и Раузе, интересны, тем не менее, по ряду других причин. Во-первых, авторы [179] показали, что петли представляют собой высококомпактные участки белка, образование которых в процессе свертывания не менее выгодно, чем образование α -спиралей и β -структур. Следовательно, широко распространенное мнение об исключительной энергетической выгоде регулярных вторичных структур и наибольшей скорости их формирования при свертывании белковой цепи лишено серьезных оснований. Во-вторых, было установлено, что в подавляющем большинстве случаев петли находятся на поверхности глобул, и играют определяющую роль в функционировании белков и их конформационной подвижности [181, 182]. В-третьих, анализ аминокислотного состава Ω -петель не выявил остатков, наделенных значительной потенцией встраиваться именно в данный вид нерегулярной вторичной структуры. Такое заключение с неизбежностью следует из сопоставления рассчитанных Лещинским и Раузе коэффициентов встречаемости аминокислот в Ω -петлях [179]. Из табл. П. 6 видно, что отклонения этих коэффициентов от 1 в положительную или отрицательную стороны так невелики, что хорошо коррелируется с данными предшествующей таблицы. Если табл. П.5 демонстрирует индифферентность аминокислот по отношению к регулярной вторичной структуре, то табл. П.6 — по отношению к нерегулярной. И здесь можно прийти к выводу, что присутствие любого иного аминокислотного остатка в α -спирали, β -структуре, β -изгибе, Ω -петле не есть проявление его имманентных свойств.

Выше отмечалось, что в начале 1970-х годов Робсон и Пейн разработали метод предсказания вторичных структур, основанный на теории информации [89—91]. В 1976 г. работа в этом направлении была про-

должна Робсоном и Сузуки [92, 93]. Однако точность предсказания по-прежнему осталась низкой. В конце 1980-х годов к методу Робсона и Пейна вновь вернулись; в результате появились три его варианта: GORI, GORII и GORIII (аббревиатура составлена по первым буквам фамилий авторов [183]). Первый вариант построен на предположении о независимости конформационных состояний остатков в трехмерной структуре белка [183]. Во втором варианте — GORII, учитываются взаимодействия каждого остатка j с последующими $j + m$ ($m < 8$) с помощью так называемых направляющих информационных параметров [184, 185]. Последние рассчитывались по частотам встречаемости пар остатков на участках $j - j + m$ четырех (Н, Е, Т и С) или трех типов структур (Н, Е и (Т + С)) базовых белков, где Н — α -спираль, Е — β -структура, Т — β -изгиб и С — неупорядоченная конформация. Наивысшим уровнем информации в принципе располагает вариант GORIII [185], поскольку в нем принимаются во внимание взаимодействия j -того остатка не только с каждым последующим ($j + m$), но и с предшествующим ($j - m$), где $m < 8$. Значения соответствующих коэффициентов, названных парными информационными параметрами, как и в предыдущем случае, для четырех и трех конформационных состояний определялись эмпирически.

Таким образом, ни один из вариантов метода GOR не учитывает взаимодействий остатков даже на трипептидном участке, а GORI — и на дипептидном. Варианты GORII и GORIII исходят из более совершенных, чем GORI, моделей, как будто бы позволяющих оценить, правда, в строго аддитивном приближении, влияние взаимодействий двух недалеко отстоящих друг от друга остатков. Однако такая оценка имеет в значительной мере формальный характер. Несмотря на безупречность математической стороны моделей Робсона, все они лишены физического смысла, поскольку, во-первых, не отражают реальной структурной организации белковых молекул, где взаимодействия не аддитивны, а кооперативны, и, во-вторых, не опираются на необходимый для корректного учета тех же аддитивных парных взаимодействий объем экспериментального материала. Даже при справедливости моделей GORII и GORIII, получение достоверных статистических данных о взаимообусловленности конформационных состояний только двух остатков требует набор базовых белков по крайней мере на 2—3 порядка больший использованного.

Несовершенство метода GOR наглядно демонстрирует табл. II.7. Точность предсказательных алгоритмов приблизительно одинаково низка во всех вариантах и не зависит от количества базовых белков. Во всех случаях качество предсказания несколько выше, когда выбор делается из трех состояний. Однако при этом возрастает неопределенность самого предсказания. Реальная точность ниже, чем может показаться из приведенных в табл. II.7 средних значений, из-за очень большого разброса. Так, при средней точности варианта GORII 46,5% (четыре состояния) у ферродоксина правильно предсказаны 22,2% остатков, цитохрома с — 34,0%, цепи А инсулина — 4,8%. В случае GORIII (51,9%; четыре состояния) структура глюкоагона правильно иден-

Таблица II.7

Достоверность предсказания трех вариантов метода GOR [183–185]

Вариант алгоритма	Базовые данные		Качество предсказания (q), %	
	Количество белков	Количество остатков	Четыре состояния	Три состояния
GORI	25	~4500	49,0	56,0
	51	8898	46,1	54,7
	55	9472	42,6	56,0
GORII	51	8898	46,1	53,8
	55	9472	46,7	57,7
	75	~12600	46,5	56,9
GORIII	68	11237	—	63,0
	74	12433	51,9	61,7

Примечание. Качество предсказания $q = F_{s+}/n$, где F_{s+} — количество правильно предсказанных остатков в состоянии s ; n — общее количество остатков в последовательности.

Таблица II.8

Сравнение предсказательных возможностей методов идентификации α -спиралей [186]

Авторы метода	Показатель качества предсказания	
	Q_3	C
П. Чоу и Г. Фасман [99]	0,65	0,23
Дж. Гарнье, Д. Осгудорп и Б. Робсон [183]	0,71	0,36
Н. Квиан и Т. Седжновский [187]	0,67	—
Д. Кнеллер, Ф. Коэн и Р. Лангридж [188]	0,79	0,55
С. Преселл, Б. Коэн и Ф. Коэн [186]	0,71	0,36

тифицирована на 17,2%, крамбина — 37,0%, цепи А инсулина — 9,5% [185].

В последние годы интерес к поиску простых статистических корреляций между аминокислотной последовательностью и вторичными структурами не ослабевает. По-прежнему предпринимаются попытки создать новые методы предсказания, усовершенствовать предложенные ранее, реанимировать забытые. Принципиальных изменений в развитии этого направления, однако, не происходит. Неизменной на протяжении трех десятилетий остается стратегия поиска, покоящаяся на вере в возможность эмпирическим путем и на основе вторичных структур решить одну из фундаментальных проблем молекулярной биологии. О практических результатах развития этой области за последнее время можно судить, например, по данным табл. II.8, заимствованной из работы С. Преселла, Б. Коэна и Ф. Коэна, предложивших еще один статистический метод предсказания вторичных структур и сравнивших его с другими, наиболее известными методами, разработанными после 1974 г. [186]. Одним из критериев качества предсказания спиральных остатков авторами выбран показатель Q_3 , который, как отмечено

выше, переоценивает возможность корреляционных методов [186]. Так, точность алгоритма Дж. Гарнье и соавт. (GORI), выраженная через Q_3 , составляет 0,71 [183]. Между тем как сами авторы алгоритма GORI, справедливо полагая, что "Простейшим и самым надежным показателем предсказательной возможности метода является относительное содержание правильно предсказанных остатков, q , ..." [185. С. 425], оценивают его точность около 50% (табл. II.7). Небольшую точность предсказания имеют и другие, представленные в табл. II.8, алгоритмы согласно второму критерию качества — показателю S , который при совершенном предсказании равен 1, а при беспорядочном — 0.

Таким образом, можно сделать вывод об отсутствии за последние три десятилетия заметного прогресса в развитии эмпирического подхода к идентификации вторичных структур.

8.3. МОДЕЛИРОВАНИЕ СВЕРТЫВАНИЯ БЕЛКОВОЙ ЦЕПИ НА ОСНОВЕ ВТОРИЧНЫХ СТРУКТУР

Анализ механизма свертывания полипептидной цепи белков с использованием эмпирических корреляций между аминокислотной последовательностью и вторичными структурами впервые был выполнен Льюисом, Шерагой и соавт. [74, 75, 78]. Идеи этого метода нашли отражение в работах Птицына [79], Денисюка и соавт. [81], Лима и соавт. [105—109], Финкельштейна и Птицына [111—115] и в ряде других исследований (например [103, 104, 110]), рассмотренных в разделе 6.1.

Следующий шаг в развитии работ этого направления был сделан Немети и Шерагой [138]. Невалентные взаимодействия в белковой глобуле они разделили на внутриостаточные и межостаточные, а последние подразделили на взаимодействия ближнего порядка, к которым отнесли взаимодействия данного остатка с четырьмя предшествующими и четырьмя последующими в цепи остатками L (n с $n \pm 4$), взаимодействия среднего порядка (n с $n \pm 5 - 20$) и дальнего порядка (n с $n \pm > 20$).

Новым для теоретического анализа процесса свертывания белковой цепи и выбора соответствующей физической модели явился вопрос о функциях отмеченных видов невалентных взаимодействий в структурной организации белковой молекулы. Вот как эти функции оценивают Немети и Шерага: "Методы, используемые для получения приближенной структуры (т.е. такой, которая соответствовала бы минимуму потенциальной энергии нативного глобулярного белка), основываются на положении о том, что конформация остатка в белке определяется главным образом (но не исключительно) внутриостаточными взаимодействиями (Котельчук и Шерага [71, 72]; Финкельштейн и Птицын [73], Шерага [189]) и принимает свое нативное состояние под влиянием ближних, средних и дальних взаимодействий (П. Поннусами, П. Варме и Г. Шерага [190]; А. Бэржес и Г. Шерага [139])". И далее авторы поясняют: "...внутриостаточные взаимодействия играют доминирую-

щую роль в определении конформационных состояний остатков белка. В то же время ближние, средние и дальние взаимодействия определяют действительные значения ϕ и ψ , которые каждый остаток принимает, не выходя за пределы своего конформационного состояния, и посредством которых точно описывается окончательная трехмерная структура свернутой полипептидной цепи (Бэржес и Шерага [139]) [138. С. 340].

Г. Немети и Г. Шерага считают внутриостаточные взаимодействия ответственными за конформационное состояние остатка, т.е. за выбор низкоэнергетической области потенциальной поверхности ϕ — ψ . При этом они ссылаются на результаты исследования Котельчука и Шераги, об ошибочности которых уже говорилось (раздел 8.1). Таким образом, вопрос о функции взаимодействий между валентно несвязанными атомами боковой и основной цепей одного остатка в процессе свертывания белка и в стабилизации его нативной конформации нельзя считать решенным.

Роль ближних межостаточных взаимодействий, т.е. взаимодействий центрального остатка в нонапептиде, изучалась Поннусами, Варме и Шерагой при анализе лизоцима [190]. Аминокислотная последовательность белка была разбита на 14 участков, по девять остатков в каждом. На одном участке при сохранении центрального остатка (n) выделялись три-, пента-, гепта- и нонапептидные фрагменты. Для каждого из них строились конформационные карты ϕ_n — ψ_n , из которых определялись нулевые приближения для последующей минимизации энергии при вариации только у n -го остатка двухгранных углов ϕ , ψ , χ_1 и χ_2 . Геометрические параметры всех других остатков фрагментов $n \pm 1$, $n \pm 2$, $n \pm 3$ и $n \pm 4$ жестко фиксировались при значениях, найденных в кристаллографической структуре лизоцима. В результате были определены оптимальные конформационные состояния центрального остатка (ϕ , ψ , χ_1 , χ_2) и значения энергии отвечающих им пространственных форм три-, пента-, гепта- и нонапептидного фрагментов в каждом из 14 выделенных участков белка. При сравнении расчетных данных с экспериментальными оказалось, что конформационные состояния всех n —х остатков в нативной структуре лизоцима соответствуют наиболее предпочтительным по энергии оптимальным формам соответствующих "свободных" олигопептидов. В 11 случаях из рассмотренных 14 наблюдаемые в нативном белке состояния n —х остатков полностью отвечали их глобальным формам в соответствующих нонапептидах, где они занимали центральное положение. Был сделан вывод о том, что внутриостаточные взаимодействия определяют возможные для остатка конформационные состояния. Только из этих состояний взаимодействия данного остатка с четырьмя предшествующими и четырьмя последующими остатками (ближние взаимодействия, по классификации Немети и Шераги) выбирают единственную конформацию, которая и реализуется в нативной структуре белка. Средние и дальние взаимодействия, по мнению авторов, не играют существенной роли [190]. Их функция заключается в дополнительной стабилизации уже детерминированного состояния остатка. Сделанные выводы, однако, нельзя признать коррект-

ными, так как фиксация в рассмотренных фрагментах всех остатков (за исключением центрального) в нативных конформационных состояниях есть не что иное, как неявный, но эффективный учет средних и дальних взаимодействий. Так как в работе Поннусвами, Варме и Шераги различные виды невалентных взаимодействий так и остались неразделенными и, по существу, анализировался их интегральный эффект, то эта работа, как и работа Котельчука и Шераги, также не решила поставленной задачи о функциях в свертывании белковой цепи внутриостаточных и межостаточных взаимодействий. Рассмотрим теперь работу Бэджеса и Шераги, постановка которой, по-видимому, была обусловлена результатами только что обсужденного исследования и сделанным в нем заключением о второстепенном значении средних и дальних взаимодействий по сравнению с внутриостаточными и ближними [139]. При традиционном представлении пространственного строения глобулярных белков в виде набора вторичных структур неизбежно стремление упростить анализ межостаточных взаимодействий, а еще лучше избежать его. Это вызвано, как отмечалось (раздел 8.1), принципиальной невозможностью в рамках эмпирического подхода учесть роль таких взаимодействий в свертывании белковой цепи и оценить их вклад в стабилизацию нативной структуры. В связи с чем выводы работы Поннусвами, Варме и Шераги должны были быть с удовлетворением восприняты всеми исследователями, разрабатывающими предсказательные алгоритмы [190]. Подкрепленное расчетной процедурой утверждение трех авторов о доминирующем значении внутриостаточных взаимодействий и подчиненной роли взаимодействий даже между соседними по цепи остатками казалось весомым и вселяло надежду на возможность обойти проблему множественности минимумов потенциальной поверхности использованием предсказательных алгоритмов для получения приближенной структуры, минимизация которой приведет к нативной конформации белка. Цель следующей работы Бэджеса и Шераги как раз и заключалась в выяснении перспективы эмпирического подхода к предсказанию конечной структуры и поиску механизма свертывания белковой цепи. В качестве тест-объекта была выбрана молекула бычьего панкреатического трипсинового ингибитора (БПТИ). Проанализировав существующие алгоритмы предсказания (Чоу и Фасмана, Шераги и соавторов, Робсона и Пейна, Лима), Бэджес и Шерага констатировали, что ни один из них не может быть использован для достижения поставленной цели. Тогда они переводят свою задачу в гипотетическую область и ведут поиск ее решения с идеальным алгоритмом предсказания. На основе известной кристаллографической структуры БПТИ, а не с помощью эмпирических корреляций, авторы относят 58 аминокислотных остатков белка к пяти конформационным состояниям (α_R , α_L , ϵ , ξ_R , ξ_L), отвечающим экспериментальным данным и низкоэнергетическим областям потенциальной поверхности конформационной карты ϕ — ψ . Каждому состоянию они приписывают усредненные по известным кристаллографическим структурам восьми белков соответствующие значения углов ϕ , ψ . Двухгранные углы боковых цепей (χ) были взяты с округлением до 5°

из рентгеноструктурных данных БПТИ. Вопреки ожиданию, оказалось, что построенная таким образом трехмерная структура даже отдаленно не напоминает нативную конформацию белка.

Ситуация не улучшилась и при минимизации энергии с учетом невалентных, электростатических и торсионных взаимодействий и водородных связей. Сравнение контурных карт расстояний между атомами S^{α} модельной и опытной конформаций показывает, что в собранной с помощью идеального алгоритма и проминимизированной трехмерной структуре белка отсутствуют все характерные особенности нативной структуры: удалены друг от друга образующие между собой дисульфидные связи цистеиновые остатки, практически нет намеков на вторичные структуры, не воспроизводится глобулярная форма молекулы трипсिनового ингибитора. Были введены дополнительные ограничительные условия, облегчающие приближение модельной структуры к нативной конформации. Однако ни учет реализуемой в белке системы дисульфидных связей (5—55, 14—38, 30—51), ни введение алгоритма сближения соответствующих остатков Cys, ни включение в расчет специальной функции, имитирующей стремление неполярных остатков оказаться внутри глобулы, а полярных выйти наружу, ничто не помогло получить пространственную форму белка, близкую к нативной. Конечно, можно было бы еще ужесточить условия и добиться совпадения. Однако это не имело бы значения, поскольку не повлияло бы на окончательный вывод о невозможности даже в случае 100%-ного правильного предсказания конформационных состояний остатков получить структуру, отдаленно напоминающую реальный белок. Причину неудачного описания структуры белка Бэржес и Шерага увидели лишь в несовершенстве расчетной процедуры, которая, по их мнению, учитывала только внутриостаточные и ближние взаимодействия. Поэтому был сделан вывод, что полученные результаты свидетельствуют о необходимости дополнить схему предсказания учетом средних и дальних взаимодействий.

А. Бэржес и Г. Шерага [139], как и авторы предыдущей работы [190], не правы, утверждая, что в расчете белка полностью игнорировались межостаточные взаимодействия среднего и дальнего порядка. В действительности эти взаимодействия в неявном виде входили в расчетную модель благодаря отнесению геометрии всех аминокислотных остатков полипептидной цепи БПТИ к нативным конформационным состояниям, являющимся конечным результатом воздействия суммарного эффекта внутриостаточных и всех межостаточных контактов. В силу использования процедур, основу которых составляет главным образом экспериментальная информация о наблюдаемых трехмерных структурах белков, результаты исследований в принципе не могут претендовать на дифференцированное отражение внутримолекулярных невалентных контактов. Таким образом, вопрос о функциональном назначении внутриостаточных и межостаточных взаимодействий в структурной организации белковой глобулы остается без ответа потому, что он по существу не рассматривался.

При анализе свертывания белковой цепи на основе концепции регу-

лярных вторичных структур не учитываются экспериментальные данные о реальном механизме самоорганизации глобулы. Иллюстрацией такого рода моделирования может служить работа Птицына и Рашина по сборке молекул апомиоглобина [104]. Авторы использовали модель полипептидной цепи, в которой до начала манипуляций с ней были заданы в виде цилиндров все α -спирали наблюдаемой нативной конформации белка. Задача сводилась к тому, чтобы, зная реальную структуру молекулы, упаковать заданные цилиндры различными способами и оценить энергию их взаимодействия. Расчет велся вручную, поэтому не были учтены все возможные структурные варианты (их миллионы). Найденное взаимное расположение спиралей, имеющее минимальную свободную энергию, совпало с нативной конформацией апомиоглобина. Однако нельзя с уверенностью говорить о том, что в результате данного исследования стала ясна функция дальних взаимодействий в структурной организации белка, поскольку в состав наперед заданных α -спиралей входит не менее 75% остатков аминокислотной последовательности.

В качестве примера моделирования свертывания белковой цепи через вторичные структуры остановимся на двух исследованиях Птицына, типичных по своей постановке, аргументации и другим качествам для работ такого плана [191, 192]. В первом исследовании ("Белковое свертывание: общая физическая модель") нативная конформация белковой молекулы представлена как "определенный вид упаковки структурных сегментов (α -спирали и β -структуры)". Главным фактором, стабилизирующим регулярные участки, считаются пептидные водородные связи, не зависящие от природы и порядка расположения аминокислот в цепи. Контакты между α -спиралями и β -структурами в нативной конформации осуществляются за счет гидрофобных взаимодействий неполярных боковых цепей, скрытых от воды. Предлагаемая автором модель белкового свертывания не может считаться общей, поскольку имеет отношение к небольшой группе белков, состоящих преимущественно из α -спиралей или β -структур.

Стабилизация супервторичных структур, как предполагает Птицын, не определяется конкретной аминокислотной последовательностью, а представляет собой некий интегрально-статистический эффект, чувствительный лишь к общей контактной гидрофобной поверхности. Оставляя это положение без какой-либо аргументации, автор формулирует "общую гипотезу направленного механизма белкового свертывания". Сущность гипотезы заключается в предположении, что "узнавание регулярных сегментов определяется не деталями аминокислотной последовательности, а взаимной локализацией этих сегментов в линейной полипептидной цепи" [191. С. 197]. Постулировав, по существу, независимость супервторичных структур от химического строения белков, автор таким образом свел проблему спонтанной сборки нативных конформаций к выработке геометрических критериев самоассоциации регулярных сегментов. Тем самым "общая физическая модель" белкового свертывания на самом деле оказалась не только не общей, но и не физической. Стадия взаимодействия вторичных структур следует за

стадией их образования. Значит, до выработки геометрических критериев упаковки вторичных и супервторичных структур необходима идентификация α -спиралей и β -структур, описание процессов их инициации, развития и терминации. Эти задачи в работе предполагаются решенными, что, как известно, не соответствует действительности. Модель Птицына описывает не весь процесс белкового свертывания, а лишь упаковку вторичных структур, т.е. завершающую стадию, быть может, не отвечающую соответствующей стадии реального механизма самоорганизации. Следует также отметить несовместимость предложенной модели с одним из постулируемых в этой же работе положений. Так, автор, рассматривая вопрос об идентификации α -спиралей и β -структур, исходит из существования корреляций между вторичными структурами и аминокислотной последовательностью, а обсуждая образование из них супервторичных структур, утверждает отсутствие таких корреляций.

В основу поиска геометрических критериев упаковки вторичных структур Птицыным положена простейшая полипептидная цепь — гомополимер из аминкислот с гидрофобными боковыми группами. Предполагается, что такая цепь в водном окружении обладает вторичными структурами, стабилизированными пептидными водородными связями, и третичной структурой, стабилизированной гидрофобными взаимодействиями боковых групп вторичных структур. Реальное поведение гомополипептидов в растворе, однако, не дает оснований для подобных предположений [159]. Молекулы гомополипептидов, как и молекулы практически всех искусственных полимеров, имеют огромное количество близких по энергии непрерывно флуктуирующих в растворе свернутых форм, среди которых могут быть линейно регулярные. В отличие от белков здесь не возникает самой простой проблемы поиска геометрии глобальной структуры; все свойства синтетических полипептидов обусловлены их статической природой. Следовательно, выбор гомополипептида для описания строго детерминированного процесса свертывания белковой цепи в конформационную стабильную трехмерную структуру нельзя признать удачным для подтверждения высказанных положений. Сомнителен также введенный автором принцип "внутренней организации участков аминокислотной последовательности, эквидистантных в отношении середины цепи" [191. С. 200], согласно которому центр всей последовательности и центры участков при последующем кратном делении цепи наделяются свойствами, не имеющими ничего общего с реальными конформационными свойствами как искусственных гомополипептидов, так и эволюционно отобранных аминокислотных последовательностей.

В другом исследовании Птицын развивает тезис об отсутствии зависимости пространственного строения белка от его химического строения и ставит под сомнение эволюционный путь развития белковых молекул. Так, он пишет: "Широко распространено убеждение, что уникальная первичная структура данного белка совершенно необходима для сворачивания в определенную пространственную структуру и для его функции и является результатом направленного отбора в ходе

Содержание некоторых аминокислотных остатков в белках, %

Белок	Arg+Lys	Asp+Glu+ +Asn+Gln	Cys	Ser+Thr
Пепсин	1,4	28,0	3,5	22,0
Химотрипсиноген	8	10,0	4,0	21,5
Миоглобин	17,7	24,7	0	8,0
Инсулин	5,5	25,4	11,8	7,3
Гистон	26,4	16,0	0	10,5
Панкреатический трипсиновый ингибитор	17,2	7,0	10,0	7,0
Протеазный ингибитор	9,8	16,9	20,0	15,5
Баумена-Бирк				
β-Липотропин	16,0	15,7	0	9,8
Белки прокариот	10,7	19,9	1,0	11,9
вирусов	10,5	19,0	2,1	14,9
позвоночных	11,4	20,2	2,5	12,6
человека	10,7	20,3	3,0	13,6

биологической эволюции. В статье представлены аргументы в пользу альтернативной точки зрения, согласно которой типичные пространственные структуры глобулярных белков характерны уже для случайных последовательностей аминокислотных остатков. Поэтому возможно, что первичные структуры белков — в основном просто примеры случайных аминокислотных последовательностей, лишь слегка отредактированных в ходе биологической эволюции для придания им дополнительного функционального смысла" [192. С. 574]. Эта мысль развивается О.Б. Птицыным и М.В. Волькенштейном также в работе [193].

Вывод о том, что белки представляют собой случайные аминокислотные последовательности и не требуют эволюционного отбора, обосновывается тем обстоятельством, что усреднение по первичным структурам белков практически не дает статистически достоверных отличий от случайного распределения аминокислотных остатков и их групп вдоль цепи. Это главный и по существу единственный аргумент Птицына для отрицания отмеченного выше фундаментального положения молекулярной биологии. Необходимо, однако, сказать, что обоснование сделанного вывода не вполне корректно, поскольку заключение о характере распределения остатков следует из анализа ограниченного экспериментального материала, что не дает права распространять его на все белки. Но это не главное. Даже если в усредненной первичной структуре распределение действительно не отличается от случайного, то отсюда еще не следует, что случайна последовательность каждого конкретного белка. О том, что усредненные характеристики белков не имеют ясного физического смысла, уже говорилось. Сказанное можно дополнительно проиллюстрировать данными табл. II.9, в которой приведено содержание некоторых аминокислотных

остатков в ряде белков, сопоставленное с усредненным содержанием тех же остатков в белках прокариот, вирусов, позвоночных и человека [194]. Из табл. II.9 видно, что даже аминокислотный состав, не говоря уже о порядке расположения остатков и длине цепи, достаточно специфичен для белков. Вывод о случайности химического строения белков не отвечает действительной их структурной организации. Противоречит он также структурно-функциональной и эволюционной организации белковых молекул.

Созданию функциональных белков предшествовало, по мнению Птицына, появление сложных аминокислотных последовательностей случайного состава и поначалу, т.е. до "редактирования", биологически бесполезных. Как известно, белки не воспроизводят самих себя. Поэтому для появления "протяженной кооперативной структуры" необходимо предположить существование готового генетического аппарата. Так как он синтезирует случайные и функционально неспецифические аминокислотные последовательности, непонятно, каким образом и почему он возник. Но даже такой, неведомо как и зачем возникший генетический аппарат, имеющий, как и "протяженные кооперативные структуры", случайную последовательность нуклеотидов, не может не только функционировать, но и быть созданным без участия огромного количества высокоспецифичных белков. Автор отказывает белкам в эволюции [192]. Очевидно, точно также следует поступить и по отношению к генетическому аппарату, их производящему. Если следовать такой логике, то это ведет уже к отрицанию эволюции органического мира вообще, поскольку в основе эволюционного развития любого организма лежит изменение его генов, т.е. программы синтезируемых белков.

8.4. КОМПЬЮТЕРНОЕ ВОСПРОИЗВЕДЕНИЕ СВЕРТЫВАНИЯ БЕЛКОВОЙ ЦЕПИ

Во второй половине 1970-х годов наряду с развитием уже рассмотренных методов моделирования свортывания белковой цепи начинает разрабатываться иной подход к решению этой проблемы. Цель его заключается в автоматическом воспроизведении процесса структурной самоорганизации белковой молекулы на основе методов конформационного анализа и минимизации энергии с использованием ЭВМ. Первая попытка воспроизведения с помощью ЭВМ свортывания белковой цепи была предпринята в 1975 г. М. Левиттом и А. Уоршелом [152]. Цель этой работы состояла, однако, не в изучении механизма сборки белковой молекулы, а лишь в выяснении возможности спонтанного свортывания сильно упрощенной модели аминокислотной последовательности в компактную глобулярную форму. Авторы представили белковую цепь в виде последовательности, в которой каждый остаток аппроксимирован двумя центрами: атомом C^α и боковой цепью в виде сферы с радиусом, равным среднему радиусу вращения соответствующей атомной группы. В такой бусиничной с шаровыми подвесками

модели остаток имеет только одну степень свободы — торсионный угол вращения относительно виртуальной связи, соединяющей два соседних атома C^α (α_1). Предполагается, что взаимодействия возможны только между сферами боковых цепей, а атомы C^α определяют лишь контур пептидного остова.

Со столь упрощенным описанием геометрии белковой цепи соизмерима и степень приближенности учета внутримолекулярных взаимодействий. При энергетической оценке предполагалось, что белковая цепь состоит не из 20 аминокислотных остатков, а из трех: Ala, Gly и Pro. Потенциалы вращения вокруг виртуальных связей C^α — C^α были получены путем усреднения энергии по всем конформациям дипептидов Ala—Ala, Ala—Gly, Ala—Pro, Gly—Gly, Gly—Ala и Pro—Ala. Принято, что каждый потенциал зависит только от природы второй аминокислоты. Для остатков Asp и Asn использован потенциал, найденный для Gly, а для остальных остатков, кроме Pro, — потенциал Ala. Выбор одинаковых потенциалов для Asp, Asn и Gly обоснован тем обстоятельством, что эти остатки часто встречаются в поворотах цепи. Таков же уровень обоснования в других случаях. Эффективный потенциал взаимодействия между двумя одинаковыми боковыми цепями Ala, Gly и Pro рассчитывался по функции типа Леннарда—Джонсона как сумма энергии взаимодействий всех атомов в одной сфере с атомами в другой. Потенциалы взаимодействий между разноименными боковыми цепями получены из среднегеометрического комбинационного правила. Свертывание модели определялось путем решения уравнений молекулярной динамики, а влияние окружающей среды учитывалось введением специальной энергетической составляющей гидрофобных взаимодействий. Последние оценивались по данным растворимости аминокислот в воде и этаноле.

Описанный метод был апробирован Левиттом и Уоршелом для расчета пространственной структуры бычьего панкреатического трипсина ингибитора. Белок, состоящий из 900 атомов и имеющий 319 конформационных степеней свободы (двухгранные углы вращения ϕ , ψ , ω и χ), был представлен бусиничной моделью из 110 обобщенных "атомов", обладающей 57 степенями свободы (углы α). Для минимизации энергии такой системы при вариации углов α выбраны следующие три начальных приближения: полностью собранная нативная конформация белка, развернутая цепь с фиксированным С-концевым α -спиральным фрагментом (остатки 48—58) и полностью развернутая цепь. Наиболее предпочтительные оптимальные конформации каждого из трех начальных вариантов имели среднестатистические отклонения от кристаллографической структуры белка 2,5, 6,2 и 7,8 Å. Минимизация энергии полностью развернутой цепи второго и третьего исходных структурных вариантов не привела к появлению каких-либо элементов белковой нативной конформации; конечный результат целиком определялся начальным приближением. Выбранная модель, таким образом, не сработала.

В другой работе этих же авторов исследована пространственная структура миогена карпа (108 аминокислотных остатков) [154]. Ис-

пользовалось такое же максимально упрощенное представление полипептидной последовательности и ее силового поля. Вопрос о свертывании белка из полностью развернутой цепи, однако, уже не ставился; все исходные приближения содержали шесть α -спиральных сегментов, наблюдаемых в нативной конформации миогена. Компьютерное воспроизведение упаковки заданных вторичных структур выполнено при трех условиях. В первом случае рассматривалось взаимодействие лишь пары α -спиралей. Было показано, что они предрасположены к достижению быстрого оптимального взаимодействия. Во втором случае аналогичная задача поставлена для четырех α -спиралей (69 остатков). Она оказалась практически нерешаемой; было получено пять конформаций со среднестатистической ошибкой около $7,0 \text{ \AA}$. В третьем случае моделировалось свертывание всей молекулы миогена из шести жестких спиралей. После длительных поисков были найдены три структуры с ошибкой $8,5 \text{ \AA}$. Таким образом, первые попытки использовать свехупрощенную геометрическую модель белковой цепи и условное силовое поле внутримолекулярных взаимодействий с учетом важнейших структурных особенностей нативных конформаций не привели к обнадеживающим результатам.

Много общего с методом Левитта и Уоршела имеет метод расчета укладки трехмерной структуры белка, предложенной Кунтцем и соавт. [155]. В данном случае белковая цепь представлялась последовательностью сфер, центры которых совмещены с атомами C^α . Радиус каждой сферы грубо эквивалентен ван-дер-ваальсову радиусу боковой цепи. В качестве независимых переменных выбраны $3n$ декартовых координат центров сфер (n — число аминокислотных остатков в белке). На свободу остатков в такой бусиничной (без подвесок) модели наложена система ограничений. Остатки могут подходить друг к другу только на определенные расстояния. Между ними имеются взаимодействия, повышающие и понижающие энергию. Гидрофобные остатки должны находиться не более чем на $S \text{ \AA}$ от центра тяжести белка, где S — функция размера молекулы и гидрофобного ядра. Метод Кунтца и соавторов был использован для описания свертывания белковых цепей панкреатического трипсинового ингибитора (58 остатков) и рубредоксина (54 остатка). При среднем расстоянии остатка от центра тяжести трипсинового ингибитора $10,3 \text{ \AA}$ и рубредоксина $9,7 \text{ \AA}$ среднестатистические отклонения опытных и рассчитанных структур составили соответственно $4,7$ — $6,0$ и $4,0$ — $6,0 \text{ \AA}$. Авторы отметили, что для белков большой молекулярной массы метод приводит к еще более неудовлетворительной точности результатов расчета.

Расчеты Кунтца и соавторов, как и Левитта и Уоршела, являются формальными. Они не базируются на каких-либо физических соображениях в отношении механизма свертывания белковой цепи, и в них не учитываются экспериментальные данные о денатурации рассматриваемых белков. Используемые в обеих работах методы минимизации энергии не позволяют исключить некорректно свертываемые структуры. Отсутствует обоснование сделанных допущений в модельном представ-

лении полипептидной цепи и силового поля. По-видимому, выбор столь далеко отстоящих от реальности расчетных моделей продиктован в обеих работах стремлением свести к минимуму машинное время счета.

Полученные в этих исследованиях результаты показали, что задача компьютерного воспроизведения свертывания белковой цепи становится решаемой исключительно за счет упрощения расчетной модели, причем такого, которое приводит к потери моделью физического смысла. Действительно, трудно рассчитывать на продвижение вперед в понимании механизма самоорганизации белка и особенности его трехмерной структуры, устраняя из анализируемой модели все то, что хотя бы отдаленно напоминает белковую молекулу, и представляя гетерогенную аминокислотную последовательность более простой, чем полиэтиленовая цепь. Было показано, что подобная модель расчета трехмерной структуры белка по своей точности не превосходит модель статистического клубка [195, 196]. Неудачу энергетических расчетов обычно видят, однако не в полном несоответствии модели и объекта исследования, а в неучете влияния растворителя, приближенности потенциальных функций, прогрессирующем накоплении ошибок с увеличением длины рассчитываемых фрагментов и множественности минимумов потенциальной поверхности, исключающей нахождение глобального минимума. Конечно, все это не мнимые трудности, но к их разрешению нельзя подойти со сверхупрощенной моделью белковой цепи. Во многих последующих работах по компьютерному воспроизведению структуры белка дополнительно используются разного рода эмпирические соотношения, кристаллографические данные, результаты статистического анализа и гомологи.

В первом комплексном подходе к описанию свертывания белка Танаки и Шераги рассмотрение упрощенной расчетной модели полипептидной цепи сочетается с привлечением данных статистического корреляционного анализа и моделированием механизма укладки цепи [156]. Авторы предполагают, что процесс образования конформации проходит через три последовательных этапа. На первом этапе (А) полностью развернутая белковая цепь складывается за счет внутри-остаточных и ближних межостаточных взаимодействий в упорядоченные вторичные структуры. Затем (этап В) под влиянием средних взаимодействий между α -спиральными и β -структурными сегментами зарождаются небольшие контактные области. При этом образованные на первом этапе регулярные формы цепи могут претерпевать изменения. На третьем этапе (С) происходит ассоциация контактных областей этапа В за счет дальних взаимодействий и образование нативной конформации белка. Начальная форма полипептидной цепи с участками вторичной структуры получена Танакой и Шерагой с помощью эмпирических правил и механико-статистической обработки однонитчатой модели Изинга. Аминокислотные остатки представлены в виде сфер основной цепи ($\text{—NH—C}^\alpha\text{H—CO—}$) и сфер боковых цепей определенных ван-дер-ваальсовых радиусов. Из анализа 25 белков известной структуры найдены частоты контактов между всеми парами

остатков (k и l) и для каждого типа пар определены константы равновесия K_{kl} и свободная энергия Гиббса ΔG_{kl} образования контакта между остатками k и l .

Процедура поиска конформации белка состоит в следующем. На стадии А цепь представляется порядком символов h , β и c , характеризующих области правой α -спирали ($\varphi = -20^\circ \dots -130^\circ$; $\psi = -10^\circ \dots -90^\circ$), β -структуры ($\varphi = -40^\circ \dots -140^\circ$; $\psi = -140^\circ \dots -100^\circ$), и клубка (все значения φ , ψ , не попавшие в первые две области). Остатки, идентифицированные с помощью предсказательного алгоритма, помечаются только одним символом (h или β), а неотнесенные остатки — тремя (h , β , c). Для свертывания цепи используется процедура Монте-Карло при последовательном введении средних (этап В) и дальних (этап С) взаимодействий и произвольном варьировании у отнесенных остатков значений углов φ , ψ в выбранной области h или β и также символов (h , β , c), а при каждом символе — значений углов φ , ψ у неотнесенных на этапе А остатков. В ходе процедуры Монте-Карло через определенные промежутки времени отбираются конформации, в которых отсутствует перекрывание жестких сфер, и оценивается их энергия при учете всех взаимодействий. Конформацию оставляют для следующего счета, если ее энергия оказывается меньше энергии предшествующей конформации. Так продолжалось до тех пор, пока энергия данного варианта не понижалась при последующих 10 000 манипуляциях.

Описанная схема использована Танакой и Шерагой для предсказания трехмерной структуры бычьего панкреатического трипсинового ингибитора. Первоначальная идентификация конформационного состояния каждого остатка символами h , β , и c и, следовательно, определение ограниченной области возможных значений φ , ψ выполнены на основе не предсказательных алгоритмов, а рентгеноструктурных данных. Конформации белка на разных стадиях процедуры Монте-Карло представлялись в виде контактных треугольников, отражающих взаимодействия между всеми парами остатков. Сопоставление контактных треугольников опытной структуры и конечной теоретической конформации молекулы трипсинового ингибитора обнаруживает существенные расхождения. В рассчитанном варианте отсутствует целый ряд контактов, присущих реальному белку, и в то же время имеется много лишних контактов. Неудовлетворительное совпадение при грубом, почти качественном способе сравнения имеет место даже в том случае, когда основная часть информации о структуре небольшого белка, а именно идентификация конформационных состояний всех остатков, была взята из эксперимента и использована в расчете на первом этапе. Помимо расчетной модели, не отражающей конформационной специфики белковой цепи, метод Танаки и Шераги ограничен также возможностями предсказательных алгоритмов. Особенно настораживает то обстоятельство, что в случае рассмотрения белка с неизвестной структурой выбранные на этапе А для остатков конформационные параметры далее не изменяются. Следовательно, допущенные при отнесении с помощью эмпирических корреляций ошибки (а они неизбежны и со-

ставляют, как известно, около 50% отнесений) в последующем расчете (этапы В и С) не обнаруживаются.

При использовании метода Монте-Карло отсутствуют объективные критерии отбора конформаций. Внушительное на первый взгляд количество в 10 000 структурных вариантов может составлять лишь небольшую часть конформаций, подлежащих анализу. Наконец, как и в методах Левитта и Уоршела, Кунтца и соавторов, аппроксимация остатков сферами в методе Танаки и Шераги продиктована не физическими соображениями, а удобствами расчета. В модели никак не отражена конформационная специфика аминокислот. В самом деле, трудно представить, как сферы могут передать конформационные свойства, например, вытянутых лабильных боковых цепей аргинина и лизина с их гидрофобными и полярными участками, имеющими четыре степени свободы (χ_1 — χ_4), или плоских боковых цепей триптофана и фенилаланина. Кроме того, потенциалы взаимодействий остатков выбраны на основе незначительного экспериментального материала.

В работе Д. Габела и соавт. [131], аналогичной только что рассмотренной работе С. Танаки и Г. Шераги, исходные конформационные состояния аминокислотных остатков берутся уже не из эксперимента, а определяются на основе эмпирических корреляций. Для идентификации вторичных структур были использованы так называемые тетрапептидный и нонапептидный предсказательные алгоритмы, разработанные соответственно Льюисом и соавт. [73] и Бэржесом и соавт. [101]. В данном случае эти алгоритмы, однако, привлекаются не к одной молекуле белка, а к серии родственных белков — 14 гомологам нейротоксина II. Трехмерные структуры всех гомологов (точнее, геометрия основной цепи) считаются идентичными.

Предварительные возможности такого подхода демонстрируются на 30 гомологичных последовательностях цитохрома с (104 остатка), пространственное строение которых полагается одинаковым и известным из эксперимента. В связи с тем, что нонапептидная модель неприменима к четырем остаткам с N- и С-концов белковой цепи, конформационное отнесение выполнено для 96-остатков. Вероятности реализации любого состояния каждого остатка в 30 гомологичных белках были усреднены. В результате из 96 остатков цитохрома с 43 отнесены к α -спиралям, вытянутой форме и β -изгибам (для предсказания последних использован "тетрапептидный" алгоритм); для 53 остатков и восьми концевых конформационные состояния определены не были. Из 43 идентифицированных остатков 33 отнесены правильно, а 10 неправильно.

Такой же процедуре на первом этапе исследования нейротоксина II (метод включал всего девять этапов) были подвергнуты 14 гомологичных последовательностей этого белка. Остатки, которые по эмпирическим правилам имели вероятность образования определенной формы в 8 (и более) случаях из 14, идентифицировались однозначно, и им приписывались углы ϕ , ψ , отвечающие среднестатистическим опытным величинам в α -спирали, β -структуре и β -изгибе. Из 57 рас-

смотренных в каждой последовательности остатков 6 были отнесены к α -спирали, 4 — к β -структуре и 16 — к β -изгибам. Здесь следует отметить два существенных, более того, решающих для данного исследования обстоятельства, на которых авторы не акцентируют внимания.

Достоверность предсказательных алгоритмов, использованных в этой работе, как показывает опыт их применения к 13 различным белкам известной структуры [101], 30 — гомологичным белкам цитохрома с и аденилаткиназе [197], является незначительной, в связи с чем в отнесении 26 остатков нейротоксина II неминуемо содержатся ошибочные предсказания, которые ни на одном последующем этапе не обнаруживаются и, следовательно, входят в конечную структуру. Неоправданным является приписывание основным цепям идентифицированных остатков усредненных значений углов φ , ψ , полученных из частот их появлений в низкоэнергетической области у известных белков. Углы φ , ψ обнаруживают в спиральной и особенно в β -структурной области разброс в пределах многих десятков, а часто более сотни градусов. Конкретные значения углов φ , ψ в этих областях определяются не столько природой остатка, сколько уникальной для каждого белка последовательностью аминокислот, т.е. прежде всего взаимодействиями данного остатка с соседними по цепи и сближенными в глобуле остатками. Приписывание остаткам средних значений двухгранных углов в макромолекуле лишено практического смысла, поскольку последующая минимизация энергии не обеспечивает их правильный спуск, а лишь приводит к варьированию вблизи заданных значений.

Отмеченные два обстоятельства предопределяют конечный результат данного исследования и делают излишним рассмотрение других его восьми этапов, на которых также допускается целый ряд неконтролируемых предположений. Поэтому не удивительно, что ни один из пяти предложенных вариантов конформаций нейротоксина II не отвечает опытным данным даже самого общего характера. В работах Д. Тзерногло и А. Петско [198, 199] и Б. Лоу и соавт. [200] приведены результаты рентгеноструктурного анализа данного белка, которые свидетельствуют, что его третичная структура имеет форму диска; все же найденные Д. Габелом и соавт. [131] структуры нейротоксина II обладают клубкообразной формой.

В 1980-е годы исследования такого плана не претерпели существенных изменений и не внесли новых идей в решение проблемы свертывания белковой цепи. Для иллюстрации рассмотрим кратко результаты теоретического анализа процесса сборки полипептидной цепи бычьего панкреатического трипсинового ингибитора С. Миязавы и Р. Джернигана [201]. Белок изображался ими в виде цепочки жестких сфер, совмещенных с атомами C^α и C^β аминокислотных остатков. Конформационными параметрами считались двухгранные углы φ , ψ , которым разрешалось принимать дискретные значения через каждые 10° . Межостаточные взаимодействия учитывались исключительно между теми парами остатков, которые в кристаллографической структуре бычьего панкреатического трипсинового ингибитора (БПИ)

образуют близкие контакты. При оценке взаимодействия между двумя остатками свободная энергия принималась равной $-2,2$ ккал/моль, если расстояние между соответствующими атомами C^β в нативной конформации белка находилось в интервале $2,4\text{--}6,5$ Å; когда оно было меньше $2,4$ Å, энергия считалась бесконечной, а больше $6,5$ Å — равной нулю. Следовательно, притяжение друг к другу могли испытывать только те остатки (жесткие сферы), атомы C^β которых сближены в реальной трехмерной структуре. Для беспорядочной генерации различных конформаций, располагающихся между нативным и денатурированным состояниями, использован метод Монте-Карло. Процесс модельной цепи оценивался по среднестатистическим величинам, отражающим степень упаковки цепи в различных местах шкалы конформационной энергии. Всего было получено 230 000 промежуточных состояний без атомных перекрытий. Авторы проследили путь перехода модельной цепи от полностью развернутого состояния к состоянию, свернутому подобно нативной структуре белка. Согласно полученным данным, процесс свертывания начинается с образования нативно подобных контактов $C^\beta\dots C^\beta$ в области β -изгиба (остатки 25—28) и α -спирали (48—56) БПТИ. Их рост приводит к сближенности атомов C^β двух β -тяжей и созданию β -структуры (14—38). Структурирование завершается образованием контактов между атомами C^β N- и C-концевых фрагментов. Весь путь свертывания представляет собой непрерывную цепочку незначительно меняющихся в сторону нативной структуры конформационных состояний. Это не удивительно, поскольку авторы исключили все неспецифические межостаточные взаимодействия. Используемый подход в принципе не может привести к воспроизведению экспериментального механизма сборки белка, так как заведомо исключена возможность появления промежуточных конформационных состояний с признаками, отсутствующими в нативной структуре.

В рассмотренных исследованиях по компьютерному воспроизведению свертывания белка используется, как уже отмечалось, сверхупрощенное моделирование полипептидной цепи. Неудовлетворительность подхода, однако, заключается отнюдь не в самом стремлении максимально упростить решаемую задачу, а в том, что этого стараются достичь за счет лишения исследуемого объекта всех специфических черт белковой молекулы. Рассчитываемые модели как в отношении своей геометрии, так и силового поля могут быть в равной мере отнесены практически ко всем линейным искусственным полимерам, причем и в данном случае они будут выглядеть упрощенными.

В подходе с упрощенными моделями используются методы минимизации энергии, которые исключают анализ значительных конформационных изменений и больших энергетических флуктуаций, что делает невозможным поиск специфических межостаточных взаимодействий, формирующих компактную глобулу. Состоятельное с физической точки зрения компьютерное воспроизведение процесса спонтанной самоорганизации трехмерной структуры белка требует не только

расчетной модели, в которой учитывались бы особенности природной гетерогенной аминокислотной последовательности, но и такого способа оценки конформационной энергии свертываемой цепи, в которой допускалась бы дифференциация специфических и неспецифических остаток-остаточных взаимодействий. Предложенные модели и используемые методы минимизации энергии не удовлетворяют обоим требованиям. Поэтому для получения разумных результатов во всех работах пришлось отказаться от априорности расчета и прибегнуть к искусственному приему, а именно к выбору в качестве исходных для минимизации энергии приближений структурных вариантов, включающих важнейшие элементы опытной нативной конформации белка, или использовать для той же цели эмпирические корреляции. Уменьшение таким путем количества неспецифических взаимодействий привело, однако, к фактическому отказу от независимого описания всего пути свертывания белковой цепи. Решение задачи приобрело чисто формальный характер и свелось к рассмотрению только завершающей стадии процесса.

Среди работ рассматриваемого направления лишь в исследовании Танаки и Шераги сделана попытка создать общий метод количественной оценки энергии образования контактов между остатками и подойти к целенаправленному выделению наиболее актуальных для свертывания белковой цепи межостаточных взаимодействий [156]. По частотам контактов между 20 природными аминокислотами, реализуемых в кристаллографических структурах 25 белков, авторы рассчитали константы равновесия, а по ним нашли значения свободной энергии образования контактов. Последние и должны были служить эмпирическими параметрами для количественной характеристики межостаточных взаимодействий. По ряду причин, прежде всего из-за недостаточного для корректной статистической обработки объема опытных данных, метод оказался неэффективным.

Более строго к решению той же задачи подошли С.Г. Галактионов и М.А. Родионов [202—204]. Опробование модельного представления и разработанного ими алгоритмического решения было осуществлено на одном объекте — молекуле БПТИ. При качественном сравнении матриц остаток-остаточных контактов расчетной и рентгеновской структур обнаруживаются некоторые общие черты: наличие β -структурного сегмента 14—38 и сближенность N- и C-концевых фрагментов. В то же время в теоретической структуре не воспроизводится α -спиральный сегмент 48—56 и имеются изломы цепи и перекрывания участков ближнего порядка, отсутствующие в реальной структуре. Авторы следующим образом оценивают полученные ими результаты: "Процедура восстановления пространственной структуры молекулы по матрице остаток-остаточных контактов в том виде, в котором она использована в настоящей работе, весьма чувствительна к малейшим изменениям структуры матрицы. Вполне возможны ситуации, когда паре матриц, совпадающих даже на 95%, окажутся сопоставленными заметно различающиеся структуры. Поэтому совершенно необходимым условием дальнейшего совершенствования обсуждаемого подхода яв-

ляется реализация решения задачи построения структуры по заданной матрице с помощью алгоритмов конформационного анализа в попарно аддитивном приближении" [203. С. 390].

Бусиничные модели белков Левитта и Уоршела, Кунтца и соавторов, как и другие упрощенные представления с привлечением разного рода эмпирических корреляций, в большей мере предназначались для воссоздания трехмерной структуры белковых молекул, чем для исследования на их основе механизма самоорганизации природной аминокислотной последовательности. Предложенная в 1978 г. Н. Го и Г. Такетоми [205] так называемая решетчатая модель белка, напротив, совсем не предназначалась для предсказания пространственной структуры белковой молекулы, а была специально разработана для изучения особенностей равновесного двухфазного процесса свертывания и развертывания полипептидной цепи.

Абстрагирование от геометрии и силового поля реальной аминокислотной последовательности здесь идет еще дальше. Белок представляется в виде плоского, а в более поздних работах — объемного решетчатого полимера, стабилизированного тремя видами взаимодействий. В отношении этих взаимодействий все условно — как их качественная, так и количественная характеристики. Остается неясным даже принцип разделения взаимодействий. Первые два вида можно отнести к внутриостаточным и межостаточным взаимодействиям. Следовательно, критерием разделения в данном случае служит не природа контакта, а его место в цепи. Однако такой критерий не отвечает третьему виду взаимодействий — гидрофобному, определяемому сложными взаимоотношениями белковой цепи с водным окружением. Функции, приписываемые этим взаимодействиям, задаются, исходя из нативной конформации белка, которая считается неизвестной.

В случае плоского варианта задачи предполагалось, что гипотетическая белковая цепь состоит из 49 мономерных единиц и ее нативная "глобулярная" структура свертывается в квадрате 7×7 . Каждая 1-я единица цепи характеризуется, во-первых, связевым углом между векторами, соединяющими три узла решетки ($i - 1$ с i ; i с $i + 1$), и, во-вторых, ближайшим окружением. Связевой угол может принимать значения 0 , $+90$ и -90° . Энергия ближних взаимодействий произвольной конформации решетчатой модели белка выражается суммой энергий связевых углов. У каждого угла энергия отлична от нуля и считается равной $-\epsilon'$ в том случае, если он соответствует связевому углу в решетчатой интерпретации нативной конформации. Таким образом, учитываемые в расчете ближние взаимодействия предпочтительно стабилизируют нативную структуру белка. Дальние взаимодействия делятся на специфические, отвечающие контактам между ближайшими соседями в исходной конформации, и неспецифические. Энергия первых меньше на ϵ (как и $-\epsilon'$, одинаковую во всех случаях) энергией вторых. Следовательно, в отношении дальних и ближних взаимодействий нативная структура белка считается самой предпочтительной.

Для учета гидрофобных взаимодействий Го и Такетоми разделили все узлы решетки на полярные и неполярные и представили белковую глобулу в виде конгломерата, состоящего из гидрофобного ядра и гидрофильной оболочки. Полярными остатками считались 24 единицы, находящиеся на "поверхности" 7×7 "глобулярной" нативной конформации, а оставшиеся 25 единиц внутри квадрата — неполярными. Предполагалось, что конформационная энергия понижается, если ближайшими соседями оказываются неполярные единицы, при этом не обязательно, чтобы они находились точно в таком же положении, как в нативной структуре белка. Поэтому гидрофобные взаимодействия не относятся к специфическим.

Конформационные изменения решетчатой модели производились методом Монте-Карло с различными относительными весами дальних и ближних взаимодействий и с вариацией соотношения между их специфическими и неспецифическими составляющими. Полученные результаты позволили авторам сделать следующие выводы общего характера. Во-первых, решетчатая модель описывает равновесный переход свертывания и разворачивания цепи как типичный двухфазный процесс (и, следовательно, как полагают авторы, модель отвечает поведению реального белка) только при определенном соотношении между специфическими дальними взаимодействиями, с одной стороны, и всеми другими взаимодействиями — с другой. Во-вторых, скорость процесса свертывания и разворачивания цепи существенно зависит от соотношения специфических и неспецифических взаимодействий. Специфические взаимодействия способствуют образованию у модели нативноподобных областей (локальных структур), объединение которых в конечном счете приводит к исходной конформации белковой молекулы. Неспецифические взаимодействия ведут к созданию у модели менее стабильных, флуктуирующих состояний. Решетчатая модель представляет свертывание белковой цепи в нативную конформацию как процесс инициации и постоянного увеличения популяции нативно подобных локальных структур относительно популяций мигрирующих и распадающихся состояний структур развернутой цепи. При увеличении влияния неспецифических взаимодействий модель вырождается в статистический клубок, а при переоценке влияния специфических ближних взаимодействий — в одномерную систему. В-третьих, согласованность специфических ближних и дальних взаимодействий увеличивает скорость свертывания полипептидной цепи и делает формирование нативной конформации белка кооперативным процессом.

В последующей работе Н. Го и Г. Абе [206] была детально рассмотрена статистико-механическая модель локальных структур, идея которой уже прослеживалась в изложенном выше исследовании Го и Такетоми [205]. Под локальной структурой понимается конформация участка полипептидной цепи, которая образуется на определенной стадии процесса свертывания и которая без существенных изменений входит в нативную трехмерную структуру белка. В отличие от общепринятого представления о том, что при свертывании полипептидной

цепи прежде всего образуются вторичные структуры, составляющие основное содержание процесса и инициирующие всю последующую сборку белковой глобулы, Го и Абе априори не отдают предпочтения ни одной локальной структуре, регулярной или нерегулярной. Важность α -спиралей, β -складчатых листов, изгибов цепи и других образований оценивается их статистическими весами и статистико-механическим поведением всей белковой молекулы с помощью парциальной функции. В этой функции не учтен вклад стабилизирующих контактов между локальными структурами на отдельных участках цепи. Отсюда и название анализируемого представления о процессе белкового свертывания как модели невзаимодействующих локальных структур.

Модель Го и Абе, по существу, аналогична бусиничной модели без подвесок Кунтца и соавт. [155], только в данном случае белковая цепь представляется не в виде отдельных аминокислотных остатков, аппроксимированных жесткими сферами, а в виде целых конформационно жестких структурных образований, каждое из которых включает непрерывный участок аминокислотной последовательности. Предположение об отсутствии взаимодействий между ними позволяет точно рассчитывать парциальную функцию модели. Но даже в этом случае неперенными условиями являются, во-первых, знание нативной конформации, во-вторых, однодоменная глобулярная структура белка и, в-третьих, равновесность и двухфазность процесса свертывания и развертывания белковой цепи. Модель наверняка становится несостоятельной, если по ходу сборки образуются локальные структуры, отсутствующие в нативной конформации белка.

Одно из наиболее существенных отличий процесса свертывания и развертывания белковой цепи от перехода спираль—клубок синтетического полимера связано с дальними взаимодействиями, обуславливающими в значительной мере глобулярную форму нативных конформаций белков. Согласно Го [207], свободная энергия глобулы по отношению к энергии полностью развернутого состояния может быть выражена суммой двух членов, пропорциональных объему и площади поверхности глобулы. При одном и том же объеме энергия системы будет минимальной в случае реализации пространственного строения белка в форме одной глобулы. Это обстоятельство послужило основанием для создания Го однодоменной глобулярной модели свертывания белковой цепи. Согласно этой модели, аминокислотная последовательность на любой стадии структурирования состоит из двух частей — глобулы и клубка, а сборка белка заключается в последовательном переходе остатков из беспорядочной, флуктуирующей области в упорядоченную, конформационно жесткую область. При таком моделировании, как и при использовании решетчатой модели белка Го и Такетоми, свертывание полипептидной цепи может происходить лишь по единственному механизму двухфазного процесса.

М. Канехиса и Т. Тсонг [208] разработали так называемую кластерную модель равновесного свертывания белковой цепи, представ-

ляющую, в отличие от однодоменной глобулярной модели, возможность существования в рамках двухфазного процесса различных путей формирования локальных структур (кластеров). Полипептидную цепь авторы рассматривают в виде альтернирующей последовательности беспорядочных и упорядоченных областей. К последним отнесены вторичные структуры, повороты цепи и гидрофобные ядра. Предположено, что их образование происходит на ранней стадии структурирования белка и обусловлено главным образом взаимодействием с окружением, которое вызывает, как и при действии поверхностно активных веществ, уменьшение свободной энергии поверхностного слоя, т.е. ослабление поверхностного натяжения. Статистический вес беспорядочной области независимо от ее размера полагается равным единице, а вес упорядоченной области из m остатков определяется произведением $S^m v^n$ (обозначения авторов), где n считается равным $m^{2/3}$. Логарифм первого множителя (S) представляет собой разницу объемной свободной энергии двух состояний ($\Delta\epsilon$), образующуюся в основном благодаря вкладам энтальпии невалентных связей в одном из них и конформационной энтропии в другом. Логарифм второго множителя (v) определяет разность поверхностной свободной энергии ($\Delta\sigma$), которая уменьшается при коалесценции упорядоченных областей (т.е. при образовании кластеров) и отделении их от неупорядоченных областей.

В модели Канехисы и Тсонга состояние полипептидной цепи может передаваться набором многих микроскопических конфигураций, отличающихся друг от друга положением вдоль цепи и размером кластеров. Важнейшими характеристиками состояния являются количества кластеров в последовательности (k) и остатков в кластере (m). Значения k и m ограничены лишь протяженностью цепи. Кластерная модель описывает равновесный двухфазный процесс свертывания, т.е. она предполагает существование только двух термодинамически стабильных состояний белковой цепи, отвечающих двум минимумам свободной энергии. Динамика кластерной модели трактуется Канехисой и Тсонгом как беспорядочный, стохастический процесс, характеризующийся вероятностью переходов промежуточных состояний. Свертывание белка включает в себя стадии зарождения, роста и миграции локальных структур. Беспорядочность процесса означает, что свертывание белковых молекул при одинаковых исходных состояниях и внешнем окружении может происходить различными путями, без соблюдения последовательности соответствующих конкретных событий, но при условии статистической идентичности путей свертывания.

М. Канехиса и Т. Тсонг показали, что динамический процесс свертывания белка четко делится на две стадии — медленную и быструю, очередность и продолжительность которых зависят от кооперативности внутримолекулярных взаимодействий макросистемы и внешних условий. В одних случаях фактором, ограничивающим скорость перехода, является быстрый рост кластера критического размера. Здесь динамика

свертывания подобна переходу спираль—клубок гомополипептида. В других случаях скорость процесса определяется более поздней стадией, когда происходит коалесценция образовавшихся ранее мелких кластеров в крупные. Такое поведение моделирует ступенчатый механизм образования трехмерной структуры белка. Авторы отмечают, что наиболее важная особенность кластерной модели заключается в том, что она демонстрирует возможность сосуществования локальных структур в условиях денатурации в зависимости от свободной энергии поверхностного слоя. Число локальных структур возрастает с ослаблением поверхностного натяжения. Это имеет место в экспериментах с денатурацией белка *in vitro* при высоких концентрациях денатуранта или низких значениях pH. В естественных физиологических условиях свертывания белка *in vivo* энергия поверхностного натяжения выше и поэтому количество локальных структур меньше.

Н. Го [209], рассматривая возможные пути достижения белковой целью промежуточного, активированного, состояния, предполагает, что этой стадии предшествует образование зародышевых, эмбриональных структур. В предложенной им модели, названной эмбрионуклеационной, возникновение эмбрионов происходит за счет ближних взаимодействий, которые могут быть как согласованными, так и не согласованными с дальними взаимодействиями, актуальными для отдельных нуклеатидов и белковой глобулы в целом. В первом случае имеют место дальнейший рост эмбриона и переход его в стабильную локальную структуру (нуклеацию). Во втором случае эмбрионы нестабильны и распадаются. При согласованности ближних и дальних взаимодействий Го допускает два механизма свертывания белка [210]. По одному из них, механизму миграционного развития, эмбрион развивается путем поверхностной сорбции остатков неупорядоченной области и слияния с соседними по цепи эмбрионами. По другому, диффузионно-коллизийному, предложенному М. Карплюсом и Д. Уивером [211], эмбриональный рост происходит в результате столкновения и последующей коалесценции двух (или более) эмбрионов, принадлежащих разным, далеко отстоящим участкам последовательности. Оба механизма не противоречат друг другу и, по-видимому, отражают разные стадии процесса свертывания. Первый связан с меньшей потерей энтропии и поэтому более предпочтителен в начальной фазе структурирования. Второй сопряжен с большой потерей конформационной свободы и может быть выгоден после создания стабильных эмбрионов, переходящих в нуклеатиды. Впрочем, П. Ким и Р. Болдвин усматривают в диффузионно-коллизийном механизме еще одну возможность объединения зародышевых форм [212]. Они предполагают, что соударение эмбрионов приводит к конформационным перестройкам, благоприятным для их коалесценции.

М. Карплюс и Д. Уивер [211] разработали теорию белкового свертывания на основе диффузионно-коллизийной модели, рассмотрев случай двух быстро диффундирующих специфических микродоменов. Из теории следует, что скорость процесса контролируется диффузией.

Однако исследование кинетики свертывания рибонуклеазы А, проведенное Болдвиним при различной вязкости растворителя, не обнаружило заметного влияния изменения скорости диффузии на скорость ренатурации белка [213]. Если не выходить за рамки эмбрионуклеационной модели, то эти данные можно объяснить свертыванием полипептидной цепи рибонуклеазы по механизму, в котором определяющими скорость процесса являются конформационные изменения эмбрионов перед их коалесценцией.

Рассмотренные модели белкового свертывания содержат ряд общих черт принципиального порядка, наличие которых совершенно неизбежно при изучении явления методами статистической физики и равновесной термодинамики. Во всех модельных описаниях динамики белковой цепи предполагают равновесность и двухфазность процесса, т.е. основываются на теории двух состояний Брандтса [214] (подробно см. гл. 11). В подтверждение этому обычно ссылаются на работы 1960-х и начала 1970-х годов, посвященные экспериментальному исследованию механизма денатурации малых белков. Однако единство моделей в этом отношении отнюдь не следует из существования однозначной трактовки результатов эксперимента. Напротив, большая часть опытных данных, особенно полученная позднее, свидетельствует о более сложном характере процесса. Дело в том, что предположение о двухфазном равновесном механизме свертывания белковой цепи становится неизбежным при выборе чисто статистического, феноменологического подхода, не учитывающего конкретную гетерогенность аминокислотной последовательности и обусловленную ею конформационную специфику. Кроме того, представление белкового свертывания в виде монотонного увеличения популяции одного оптимального состояния при одновременном, точно таком же уменьшении популяции другого оптимального состояния и при отсутствии видимого количества промежуточного метастабильного состояния накладывает существенное ограничение на предполагаемую динамику процесса и упрощает его рассмотрение. В этом простейшем варианте свертывания белковой цепи профиль популяции (W) выражается зависимостью свободной энергии от степени упорядоченности, имеющей больцмановский вид $k \ln W$. Другая общая черта касается представления о нативной конформации белковой молекулы. Во всех моделях важнейшей характеристикой упорядоченного состояния белка считается глобулярность его пространственной организации. Под глобулой подразумевается структура, удовлетворяющая следующим двум условиям. Во-первых, размер глобулы значительно превышает эффективное расстояние действия сил, ее формирующих. Это условие позволяет выразить свободную энергию глобулы через ее объем и поверхность. Во-вторых, глобула предполагается структурно гомогенной, что избавляет от учета гетерогенности белковой цепи и неравномерности упаковки аминокислотных остатков в нативной конформации.

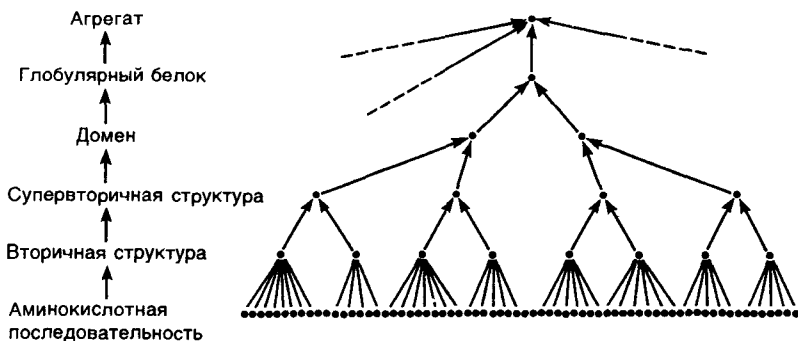
Далее, во всех существующих моделях, несмотря на использование статистических методов и равновесной термодинамики, исключается

чисто беспорядочно-поисковый механизм свертывания белка. В основе физического моделирования сборки нативной конформации лежит концепция нуклеационного свертывания. В концепции предполагается наличие в коротко живущем переходном состоянии белковой цепи упорядоченных и неупорядоченных областей. По ходу процесса свертывания—развертывания эти области испытывают действие как статистических, так и детерминированных сил, которые приводят систему к минимуму свободной энергии нативной конформации или флуктуирующего клубка. Таким образом, все модели в той или иной степени учитывают кооперативность межостаточных взаимодействий и детерминированный характер процесса свертывания. Различия между моделями не касаются принципов, а связаны с конкретным представлением активированного состояния и с постулированным механизмом свертывания—развертывания цепи. Наконец, все модели, разработанные на основе методов статистической физики, объединяет еще одно свойство. Они не являются практическим воплощением независимой системы постулатов или эвристических соображений. Модели не базируются на самостоятельной теории, а поэтому получаемые с их помощью результаты лишены априорности, не содержат качественно новой информации об изучаемом явлении и не в состоянии что-либо подтвердить или опровергнуть. Модели исходят из предположения о двухфазном механизме белкового свертывания. Однако справедливость этого допущения остается непроверяемой, поскольку конечный результат моделирования известен заранее; он предопределен использованием всех опытных данных о нативной конформации, которые необходимы для ее правильного компьютерного воспроизведения.

Глава 9

ВЫСШИЕ УРОВНИ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ГЛОБУЛЯРНЫХ БЕЛКОВ

Общепринятое представление о структурной организации молекул глобулярных белков передает схема Шульца и Ширмера [157]. В самой общей, краткой и подкупающе выразительной форме она отражает господствующее, едва ли не единственное, мнение о принципах пространственного строения белковых молекул, их иерархической (пирамидальной) структурной организации и даже механизма сборки нативной конформации из развернутой аминокислотной последовательности (рис. II.4). Считается, что схема уровней структурной организации белков Шульца и Ширмера обобщает накопленный экспериментальный материал и отвечает современному уровню наших знаний о белке. Упрощенность этой схемы авторы видят только "...в предположении,



Р и с. П.4. Уровни структурной организации глобулярных белков [157]

что взаимодействия всех видов четко разграничены, нет взаимодействий между несоседними в полипептидной цепи элементами или между элементами разных уровней” [157. С. 83]. Никаких сомнений в общности схемы структурных уровней организации глобулярных белков у авторов нет.

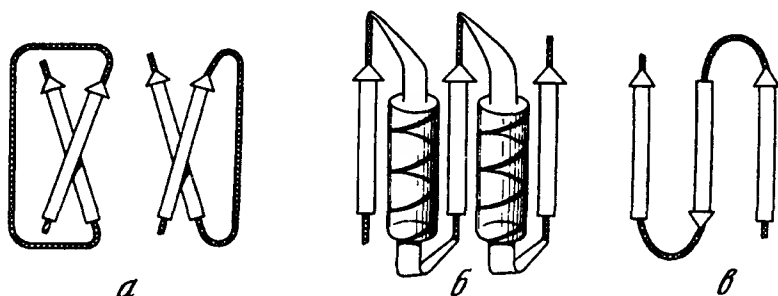
9.1. СУПЕРВТОРИЧНЫЕ СТРУКТУРЫ

Схема Шульца и Ширмера отличается от аналогичной схемы Линдерстрем-Ланга большей детализацией пространственной организации белковой цепи на пути от вторичных структур к третичной. Г. Шульц и Р. Ширмер добавили уровень супервторичных структур для обозначения энергетически предпочтительных агрегатов вторичных, регулярных структур.

Первые супервторичные структуры были постулированы в 1952 г. Криком [215] и в 1953 г. Полингом и Кори [216] при интерпретации тонких различий в рентгенограммах α -кератина и α -спиралей синтетических гомополипептидов. Ф. Крик описал структуру α -кератина с двумя и тремя нитями в жгуте, объяснив выгодность скручивания единичных спиралей образованием дополнительных взаимодействий между боковыми цепями. Л. Полинг и П. Кори предложили для α -кератина модель жгута из семи α -спиральных нитей. Позднее были предложены супервторичные структуры и они действительно были обнаружены на линейных участках тропомиозина, легкой цепи меромиозина, коллагена и т.д., т.е. фактически у всех фибриллярных белков. Наличие сложных образований из α -спиралей, β -складчатых листов, других регулярных форм и их различных комбинаций является, таким образом, характерной чертой пространственной организации фибриллярных белков, точнее, регулярных компонентов этих белков.

Геометрические параметры одиночных α -спиралей при их скручивании в жгут претерпевают небольшие отклонения от своих оптимальных значений, которые не приводят к заметному повышению энергии. Суперспирализация может осуществляться приблизительно

с равным успехом при параллельном и антипараллельном направлениях аминокислотных последовательностей. Выбор в каждом случае диктуется наилучшими условиями упаковки боковых цепей в местах контактов спиралей. Супервторичные структуры могут быть построены не только из α -спиралей, но и включать β -структуры. В общем случае состав супервторичных структур описывается звеньями ($\alpha\alpha$), ($\alpha\beta$), ($\beta\alpha$), ($\beta\beta$), ($\beta\xi\beta$) и их комбинациями. Звено ($\beta\xi\beta$) состоит из двух β -складчатых листов (с параллельным и антипараллельным направлением двух β -тяжей в каждом β -листе) и сочленения ξ , которое может быть также β -складчатым листом ($\beta\beta\beta$), являться α -спиралью ($\beta\alpha\beta$) или не иметь



Р и с. II.5. Супервторичные β -структуры, образующие звено $\beta\xi\beta$

a — ($\beta\beta$) — нерегулярные сочленения параллельных β -складчатых листов, образующих левую скрученную β -суперструктуру; *б* — ($\beta\alpha\beta$) — так называемая укладка цепи по Россману; *в* — ($\beta\beta\beta$) — β -изгиб, являющийся антипараллельной трехцепочечной β -супервторичной структурой [157]

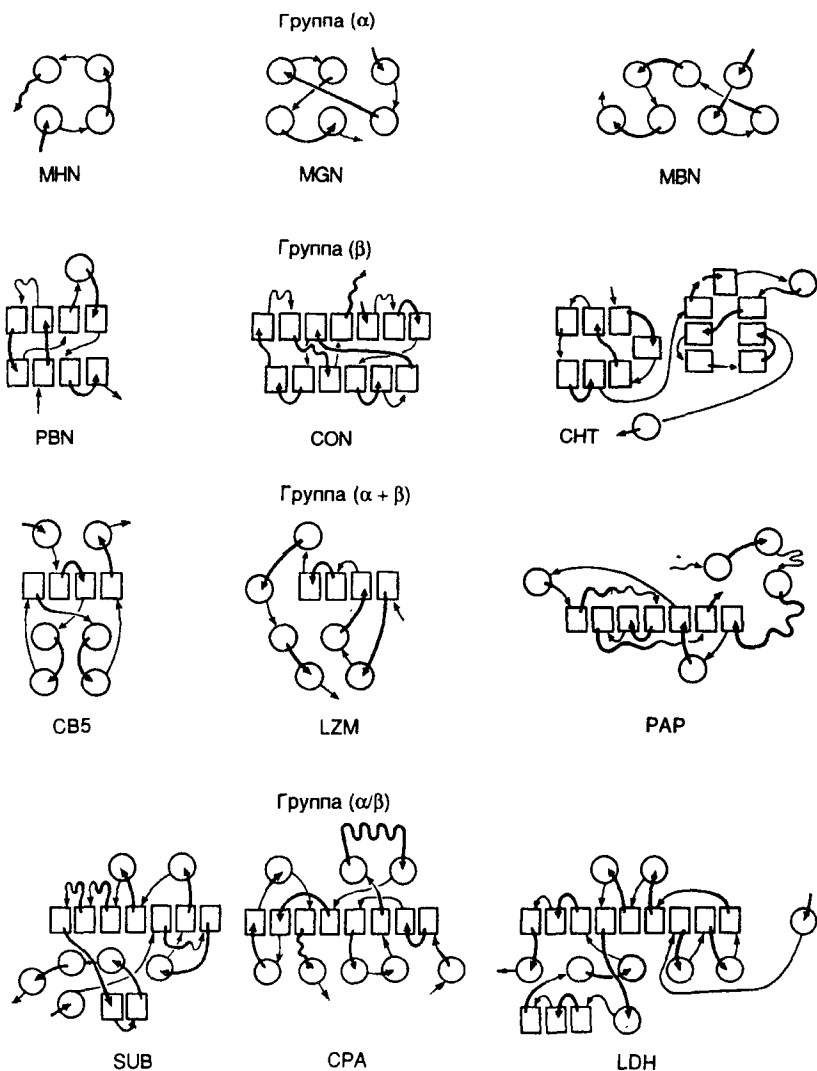
регулярной формы $\beta\beta$. Отмеченные три последних случая показаны на рис. II.5.

Определение супервторичных структур по порядку чередования в аминокислотной последовательности вторичных, регулярных форм, их взаимному направлению и хиральности, т.е. правой или левой закрутке, получило название топологии полипептидной цепи [157]. Как отметили Немети и Шерага, такая трактовка топологии не строго соответствует математическому определению этого термина [138. С. 258]. Тем не менее он получил уже широкое распространение.

Введение Г. Шульцем и Р. Ширмером понятия топологии полипептидной цепи и разработанный С. Рао и М. Россманом [217] метод упрощенного представления пространственного строения белковых молекул сделали возможным сопоставление структур белков между собой (содержащих вторичные и супервторичные сегменты), их анализ и выявление общих черт и особенностей. До этого могли сравниваться отдельные участки белковых цепей, как правило, регулярных, или полные структуры, но только родственных белков.

Новые методологические элементы были использованы М. Стернбергом и Дж. Торнтоном [140—145], К. Нагано [136, 137] и другими для идентификации в белках топологического звена $\beta\alpha\beta$, определения

хиральности у параллельных β -складчатых листов и решения других подобных задач. Заметным событием в развитии эмпирического подхода явилось появление в 1976 г. работы М. Левитта и С. Чотиа [218]. Авторы использовали простые двумерные представления известных кристаллографических структур 31 белка для анализа характерных особенностей структурной организации содержащихся α -спиралей и β -складчатых листов. В соответствии с формой регулярных структур и характером их распределения вдоль аминокислотной последовательности выбранные белки были разбиты на четыре группы (α), (β), ($\alpha + \beta$) и (α/β) (рис. II.6). К группе (α) отнесены белки, трехмерные структуры которых содержат только α -спирали, причем в них входит не менее 60% остатков (миогамеритрин, миоген, миоглобин). Белки группы (β) состоят главным образом из β -складчатых листов. Здесь требование к частоте содержания вторичной структуры не столь строго, допускается наличие единичных α -спиралей и меньшее содержание β -структур. В эту группу включены проальбумин, конканавалин А, химотрипсин и др. Белки группы ($\alpha + \beta$) имеют в нативных конформациях α -спиральные и β -структурные сегменты, которые не взаимодействуют между собой и, как правило, удалены друг от друга в последовательности (цитохром b_5 , лизоцим, папаин и др.). Группу (α/β) составляют белки, α -спирали и β -складчатые листы которых смешаны или альтернируют вдоль цепи (субтилизин, карбоксипептидаза, лактатдегидрогеназа и др.). В конформациях глобулярных белков в принципе возможна реализация 12 видов супервторичных структур, составленных путем двойных и тройных комбинаций α -спиралей и β -структур. М. Левитт и С. Чотиа в выбранных белках обнаружили лишь пять из них: ($\alpha\alpha$), ($\beta\beta$), ($\beta\alpha$), ($\beta\beta\beta$) и ($\beta\alpha\beta$). Это отнесение условно, поскольку авторы не учли разделяющие вторичные структуры, неупорядоченные участки, которые часто состоят из нескольких десятков остатков, т.е. значительно превосходят по размеру регулярные участки и в выделенных фрагментах являются не промежуточными вспомогательными группировками, а скорее основными. Супервторичные структуры, обнаруженные в анализируемых белках, распределяются следующим образом: ($\alpha\alpha$) — 27, ($\beta\beta$) — 34, ($\beta\alpha$) — 19, ($\beta\beta\beta$) — 14 и ($\beta\alpha\beta$) — 12. Из общего количества вторичных структур (361), содержащихся в рассматриваемых белках, 238 (66%) входят в состав одной из перечисленных супервторичных структур. Следовательно, даже в специально отобранных белках с наивысшим содержанием остатков в регулярных сегментах третья часть всех α -спиралей и β -структур предпочитает взаимодействовать в нативных конформациях не друг с другом (т.е. не образовывать супервторичные структуры), а с нерегулярными участками цепи. Если же учесть, что в выбранных белках содержание α -спиралей и β -структур составляет 60%, т.е. в два раза превосходит среднестатистический уровень, то полученное Левиттом и Чотиа соотношение между содержаниями супервторичных структур (66%) и "изолированных" вторичных структур (34%) свидетельствует о случайности образования первых. На статистический характер происхождения супервторичных структур указывает также отношение количества двойных комбинаций ($\alpha\alpha$), ($\beta\beta$), и ($\beta\alpha$)



Р и с. II.6. Топологические диаграммы трехмерных структур белков четырех групп

α : MHN — миогаммеритрин, MGN — миоген, MBN — миоглобин; (β): PBN — преальбумин, CON — конканавалин А, CHT — химотрипсин; ($\alpha + \beta$): CB5 — цитохром b_5 , LZM — лизоцим, PAP — папаин; (α/β): SUB — субтилицин, CPA — карбоксипептидаза, LDH — лактатдегидрогеназа [218]

(80) к количеству тройных комбинаций ($\beta\beta\beta$) и ($\beta\alpha\beta$) (28). Таким образом, в нативных конформациях глобулярных белков супервторичные структуры не обладают предпочтительностью перед структурами, состоящими из единичных α -спиралей (или β -складчатых листов) и нерегулярных участков последовательности.

Классификация белков по форме и распределению регулярных

структур лишена общности, поскольку касается не всех белков, а только тех, трехмерные структуры которых хоть как-то можно представить в виде набора вторичных структур. Таких белков, как известно, немного. Классификация белков в соответствии с упрощенным представлением их пространственных структур не обоснована с физической точки зрения, в ее основу положены чисто внешние, схематизированные морфологические признаки. Отсутствуют также серьезные основания считать α -спирали и β -складчатые листы единственными жесткими образованиями нативных конформаций белков. Но даже если не выходить за узкие рамки белков с высоким α -спиральным и β -структурным содержанием, то и в этом случае разделение белков на четыре группы представляется условным и вряд ли целесообразным. Лишь первые две группы (α и β) определены достаточно однозначно. Белков, состоящих только из α -спиралей или β -структур, мало. Для отнесения белков к группам ($\alpha + \beta$) и (α/β) объективных количественных критериев вообще нет и граница между ними по существу отсутствует. Из рис. П.6 видно, что в группу ($\alpha + \beta$) входят белки, содержащие признаки (α/β), и наоборот. О неоднозначности деления свидетельствует, например, тот факт, что Левитт и Чотиа относят лактатдегидрогеназу к группе (α/β), а Шульц и Ширмер [157] — к двум группам: С-конец — к ($\alpha + \beta$), а N-конец — (α/β). Первые помещают инсулин и папаин в группу ($\alpha + \beta$), а вторые — инсулин в группу (α), а папаин — в (α) и (β). Частично недоразумения связаны с тем обстоятельством, что Левитт и Чотиа классифицируют по группам целые белковые молекулы, а Шульц и Ширмер — так называемые структурные домены, о которых они сами же пишут, что "...определение домена весьма нестрогое и здесь может возникнуть много спорных ситуаций" [157. С. 103].

9.2. ДОМЕНЫ

Представление о пространственной организации белковой цепи не только в виде цельной компактной глобулы, но и в форме нескольких слабо связанных между собой глобулярных областей неоднократно высказывалось рядом авторов при анализе кристаллографических структур отдельных белков. Впервые это было сделано Д. Филлипсом в 1966 г. при описании структуры лизоцима в виде нескольких "компактных глобулярных блоков" [219]. Подобные, но более обособленные друг от друга структурные образования были отмечены у иммуноглобулинов Б. Каннингхэмом и сотр. в 1971 г. [220]. Для характеристики трехмерных структур белков этой группы ими была сформулирована гипотеза доменов в предположении о независимости генетического контроля каждой структурно автономной области. Вне связи с иммуноглобулинами доменная организация трехмерной структуры была отмечена в 1972 г. Дж. Бирктофтом и Д. Блоу у α -химотрипсина [221]. Нативная конформация этого белка включает два домена, каждый из которых, по мнению некоторых авторов, имеет цилиндрическую

форму, образованную шестицепочечной антипараллельной β -структурой. Такой же топологией обладают трехмерные структуры эластазы и трипсина, а также структуры аспартатных протеиназ (пепсина, ризопуспепсина, эндотиопепсина и др.). Четко делится на две части также нативная конформация папаина [222—224]. Однако здесь домены имеют разную структуру; один содержит только α -спирали, а другой — преимущественно β -структуры. На самом деле в доменизации папаина вторичные структуры скорее всего не играют существенной роли, поскольку содержание α -спиралей (очень неправильных) в белке не превышает 20%, а β -структур — немногим более 10%.

К. Анфинсен обнаружил существование двух доменов у стафилококковой нуклеазы [225]. Они обладают повышенной стабильностью, проявляющейся в большей денатурационной устойчивости. Доменная структура NAD(никотинамидадениндинуклеотид)-зависимых дегидрогеназ, как и у иммуноглобулинов, связывается со слиянием генов. У лактатдегидрогеназы, малатдегидрогеназы, алкогольдегидрогеназы и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы один из структурных доменов везде выполняет одну функцию, являясь NAD-связывающим центром. В связи с этим он отличается в ряду перечисленных ферментов большим постоянством в своем химическом и пространственном строении [226]. В два домена складываются также полипептидные цепи фосфоглицераткиназы и гексакиназы [227—229].

Впервые обратили внимание на домены как на важную и характерную особенность нативных конформаций глобулярных белков Д. Уетлауфер [230] и М. Россмани и А. Лильяс [197]. Д. Уетлауфер объясняет существование доменов спецификой механизма самопроизвольной сборки белковой аминокислотной последовательности в нативную конформацию. Он различает два вида доменов с непрерывной и прерывной полипептидной цепью, из которых наибольшее значение придает первому виду. Элементом, цементирующим структуру домена, считается ядро (нуклеация) из 8—18 остатков, образование которого при беспорядочном поиске может быть осуществлено за разумный в биологической шкале времени период. Ядро служит матрицей для укладки полипептидной цепи домена, размер которого определен в 40—150 остатков. Такая организация домена, напоминающая описанную Филлипсом организацию "компактных глобулярных блоков" лизоцима, обеспечивает быструю спонтанную сборку всей структуры белка [219]. Одним из самых важных условий такой сборки, по мнению Уетлауфера, является непрерывность образующей домен цепи. Только в этом случае возможно, во-первых, максимально быстрое возникновение нуклеации и, во-вторых, быстрый рост до размера домена, поскольку потери времени на диффузию и ориентацию при добавлении к структуре нуклеации соседних в последовательности остатков будут меньше, чем при добавлении удаленных остатков. Поэтому домены, образованные из одной непрерывной цепи, должны возникать первыми и превалировать над доменами из двух (и более) цепей, что и наблюдается.

Соображение Р. Дулиттла о том, что отдельные домены сложных

белков кодируются разными экзонами, получило подтверждение и дальнейшее развитие в исследованиях, посвященных влиянию особенностей структуры гена на скорость сворачивания кодируемого белка [231].

И. Парвис и соавт. [232] идентифицировали в составе гена трехдоменной пируваткиназы участок, отвечающий продолжительной паузе в трансляции аминокислотной последовательности. Подобные паузы необходимы, как полагают авторы, для обеспечения правильной сборки мультидоменных белков *in vivo* [231—234].

Н.К. Наградова и В.И. Муронец [235], говоря о важности доменной организации белковых молекул, идут дальше. Они считают, что образование доменов является общим принципом формирования трехмерных структур ферментов, которые только благодаря этому обретают возможность осуществлять биокатализ. "Стало очевидно — пишут они, — что основные свойства ферментов, обеспечивающие как реализацию катализа, так и регуляцию его эффективности, в той или иной степени определяются их мультидоменной структурой" [235. С. 7]. Поскольку известно много однодоменных ферментов, то такое обобщение вряд ли можно считать очевидным.

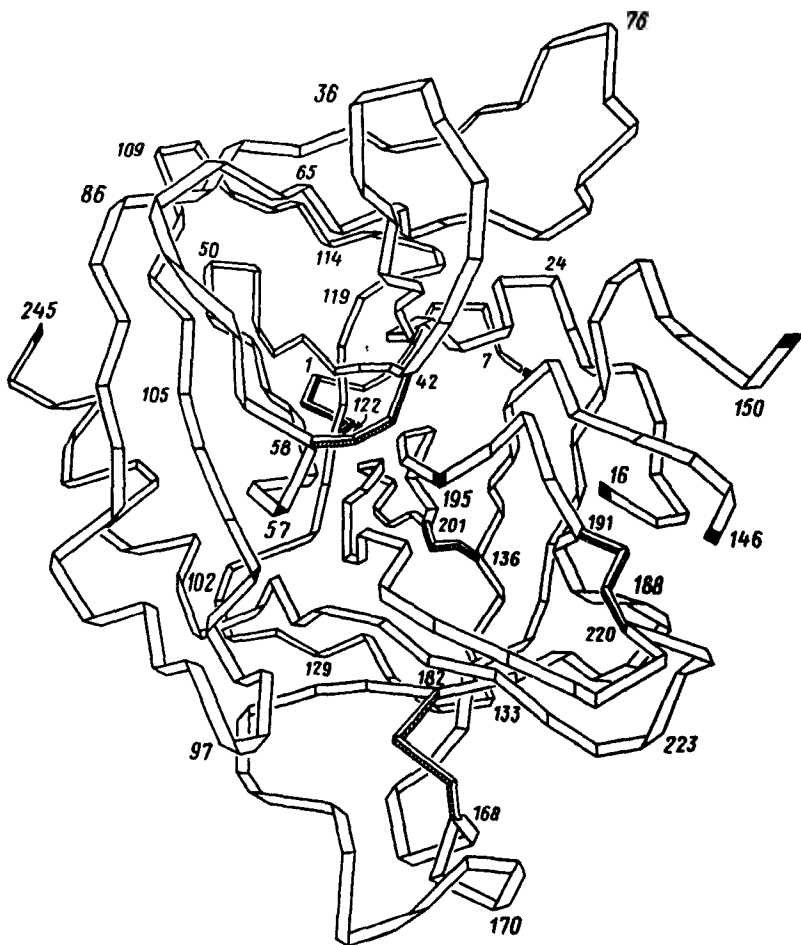
М. Россмани и А. Лильяс [197] также отметили большую распространенность доменной организации белков и важность ее изучения для лучшего понимания механизма свертывания полипептидной цепи и установления зависимости между структурой и функцией. Для выявления и сравнения структурных доменов они предложили использовать карты межостаточных контактов, впервые построенные Филлипсом [236]. Карта представляет собой диаграмму, на обеих осях которой нанесена аминокислотная последовательность белка, а на пересечении идущих от отставков горизонталей и вертикалей указаны расстояния между соответствующими атомами C^α . Одинаковые расстояния соединяются линиями, и карта приобретает контурный вид. Оказалось, что с помощью такого двумерного графа легко обнаруживаются домены и характер их пространственной организации. И. Кунтц [237] показал, что карты межостаточных контактов чувствительны к вторичным и супервторичным структурам, и связал виды этих структур с профилем контурной карты.

Четкой корреляции между доменной организацией и размером белка не существует. Например, трехмерные структуры белка бактериохлорофилла (~330 остатков), карбоксипептидазы (307) и субтилизина (275) представляют собой цельные глобулы, а структуры значительно меньших белков, например лизоцима Т4 (164) и протеиназы 13 (186), состоят из двух доменов. Отсутствует какая-либо связь между доменной организацией и содержанием в белке вторичных структур. Известны домены, в которых α -спирали и β -структуры составляют около 50% (термолизин), и такие, где они вообще отсутствуют (центральный домен из 200 остатков Туг—тРНК-синтетазы).

Рассмотрев супервторичные структуры и домены — два новых конформационных уровня, введенных Шульцем и Ширмером в схему структурной организации глобулярных белков (рис. II.4), — обратимся вновь к этой схеме, чтобы ответить на ряд вопросов. Первый и самый

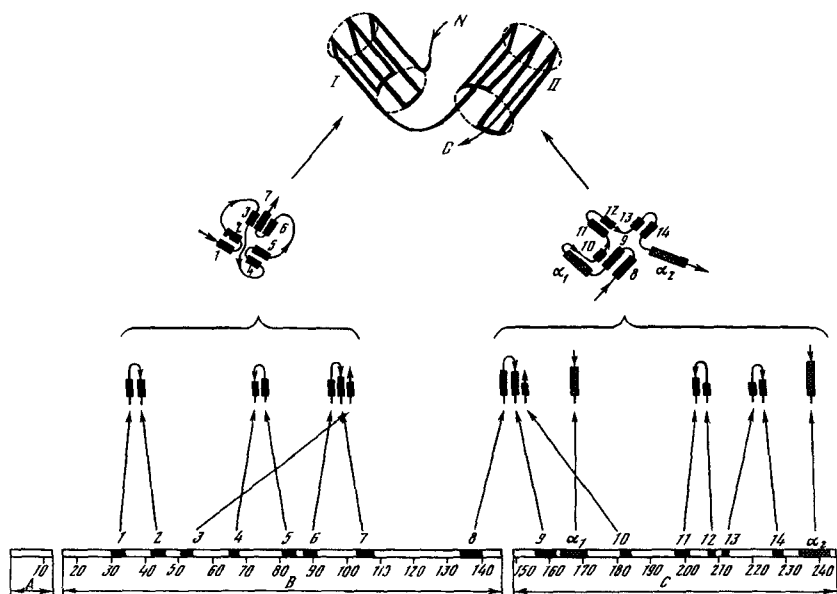
главный вопрос, который определяет ценность любого научного достижения, заключается в установлении сферы действия полученных данных или сделанных обобщений. Справедлива ли для всех глобулярных белков утверждаемая схемой Шульца и Ширмера иерархическая ступенчатая связь между порядком расположения аминокислот в полипептидной цепи и нативной конформацией белковой молекулы через последовательное образование вторичных структур, супервторичных структур и доменов? Ответ на этот вопрос отрицателен. Схема лишена общности, она не отражает структурной организации подавляющего большинства глобулярных белков. Основанием для такого заключения служат многочисленные факты существования белков, трехмерные структуры которых, во-первых, вообще не содержат регулярных участков полипептидной цепи, т.е. вторичных структур (ферродоксин, фосфолипаза, агглютинин и др.); во-вторых, имеют домены, которые не включают вторичные и супервторичные структуры (например, Туг—тРНК-синтетаза); в-третьих, состоят из более чем наполовину нерегулярных, компактным образом уложенных полипептидных цепей (папаин, химотрипсин, эластаза — на 65%; стафилококковая нуклеаза — на 70%; лизоцим, нуклеаза, рибонуклеаза — на 60% и т.д.); в-четвертых, не обладают доменной организацией (более половины глобулярных белков, пространственное строение которых известно). Быть может, схема Шульца и Ширмера правильно передает взаимоотношения между различными конформационными уровнями у части соединений данного класса с доминирующим содержанием вторичных и супервторичных структур? При справедливости в этом случае, пусть частичном, ценность схемы полностью не пропадает, поскольку тогда путь к установлению обобщенного для всех глобулярных белков плана структурной организации неминуемо, как от простого к сложному, пройдет через познание деталей схемы. Ведь не может же быть сомнений в наличии единой физической основы укладки белковых цепей в полностью иррегулярные конформации и в конформации, состоящие из α -спиралей и β -структур.

Для решения вопроса о применимости обсуждаемой схемы к ограниченному кругу белков рассмотрим конкретный пример с α -химотрипсином — белком, который во всех работах последних лет, вслед за Левиттом и Чотиа [218], относят к группе (β) и структурную организацию которого трактуют в полном соответствии со схемой Шульца и Ширмера через ассоциацию вторичных структур в супервторичные, последние в домены, домены в окончательную трехмерную физиологически активную структуру. α -Химотрипсин представляет собой трехцепочечный белок с коротким участком А (13 остатков) и более длинными участками В и С (соответственно 131 и 97 остатков), которые образуются при активации химотрипсиногена A_a посредством расщепления его трипсином. На рис. II.7 показан ход основной цепи нативной конформации фермента, полученной Бирктофтом и Блоу при рентгеноструктурном исследовании белка с разрешением $2,0 \text{ \AA}$ [221]. Считается, что трехмерная структура α -химотрипсина включает два домена, один из которых составляет N-концевой участок (1—128),



Р и с. II.7. Ход полипептидной цепи α -химотрипсина [221]

а другой — С-концевой (129—245). В данном случае такое разделение глобулы белка условно, поскольку домены явно не проявляются на картах электронной плотности и лишь с трудом обнаруживаются специальным корреляционным методом, учитывающим взаимное расположение остатков в линейной последовательности и пространстве. Каждый из доменов содержит по семи β -тяжей, которые образуют четыре антипараллельных β -складчатых листа и две супервторичные структуры ($\beta\beta\beta$), также с антипараллельным ходом цепи. Размер β -структур колеблется от трех остатков до семи. Второй домен, кроме того, включает две α -спирали из восьми и десяти остатков. Из 241 остатка, образующего белок, в β -структуры входят 66 остатков (27%). а в α -спирали — 18 (7%). Таким образом, две трети остатков α -химо-



Р и с. II.8. Схема уровней структурной организации α -химотрипсина (по Шульцу и Ширмеру) [157]

трипсина образуют нерегулярные области нативной конформации. Заметим, что и выделенные вторичные структуры также не отличаются регулярностью. Разброс значений углов, усредненных по 14 β -структурам, равен около 70° , а углов ψ — 45° ; у α -спиралей разброс углов ϕ составляет 65° , а ψ — 60° .

Теперь, следуя схеме Шульца и Ширмера (рис. II.4), опишем образование нативной конформации фермента, а затем сопоставим предполагаемый ступенчатый процесс ее образования с приведенными выше опытными фактами. Конечно, речь не идет о строгом доказательстве соответствия гипотетического представления реальной картине. Вопрос заключается только в выяснении возможности описания спонтанного процесса свертывания белковой цепи в нативную конформацию через регулярные структуры разных степеней сложности. На рис. II.8 изображены уровни структурной организации α -химотрипсина, отвечающие схеме Шульца и Ширмера. Сначала на локальных участках неструктурированной белковой цепи образуются короткие регулярные β -тяжи и α -спирали, которые, как считают, энергетически более предпочтительны по сравнению с любыми другими структурами и поэтому возникают прежде всего. После возникновения единичных вторичных структур создаются β -складчатые листы и супервторичные структуры. Их возникновение объясняется энергетической предпочтительностью или предпочтительностью в отношении кинетики процесса свертывания белка. Далее, между β -структурами α -химотрипсина осуществляются

избирательные взаимодействия, которые приводят к формированию доменов, являющихся самыми крупными элементами свертывания белка. Их ассоциация создает окончательную трехмерную структуру. По Шульцу и Ширмеру, топология конформации α -химотрипсина представляется в виде двух цилиндрических образований из β -структур (рис. II.8) [157]. Каждый цилиндр имеет приближенную внутреннюю симметрию группы C_{2v} . Создающая цилиндр полипептидная цепь изгибается только в определенных местах и регулярна на всех локальных участках. Модель белковой молекулы, внешне созданная из β -структур, супервторичных структур и доменов, ничего общего не имеет с моделью, построенной на основе экспериментальных данных (рис. II.7), а цилиндрические домены I и II лишь отдаленно напоминают пространственное строение соответствующих фрагментов нативной конформации α -химотрипсина. Но дело, конечно, не во внешнем сходстве. Важно, чтобы гипотетическая модель правильно передавала суть наблюдаемой структуры и отражала основные ее особенности. Однако и в этом отношении между сравниваемыми структурами практически нет ничего общего. Согласно экспериментальным данным, у α -химотрипсина имеется 14 β -структурных участков, а на постройку цилиндров нужно только 12. Две β -структуры не обнаруживаются в гипотетической модели. Кроме того, в ней отсутствуют даже α -спирали, так как α -химотрипсин был включен в группу β -белков, которым они не характерны.

Рассмотренный пример не является исключением. Так, С-концевой полипептид папаина из 110 остатков, представляющий собой достаточно автономную область трехмерной структуры, был отнесен, как и α -химотрипсин, к β -структурным белкам [157]. Следовательно, формирование его конформации должно проходить в принципе так же, как у рассмотренного фермента. Но С-концевой домен папаина содержит лишь восемь β -структурных остатков и приходится описывать весь процесс укладки, не воспользовавшись другими 102 остатками, в том числе 11 α -спиральными. Еще один пример. Инсулин причислен к α -структурной группе [157]. Поэтому при сборке его структуры не замечается уже β -структурный участок. Принципиальный недостаток схемы уровней структурной организации глобулярных белков Шульца и Ширмера заключается в том, что в ней не учитывается существование нерегулярных участков полипептидной цепи, иными словами, сборка третичной структуры представляется только путем ассоциации вторичных и супервторичных структур и состоящих из них доменов. И такое представление не претерпело каких-либо изменений и остается общепринятым и сегодня. В 1989 г., т.е. спустя десять лет после выхода в свет монографии Г. Шульца и Р. Ширмера, Г. Фасман писал: "...стало очевидно, что третичное свертывание определяется главным образом упаковкой α -спиралей и/или β -структур... Супервторичные структуры являются главными компонентами доменов, которые, будучи собранными, составляют трехмерные конформации белков" [238. С. 236].

Если речь идет о свертывании гетерогенной аминокислотной по-

следовательности, нет оснований разделять полипептидную цепь на регулярные и нерегулярные участки, противопоставлять друг другу их конформационные свойства и отводить нерегулярным участкам второстепенную роль в организации трехмерной структуры, полагая, что они в чем-то (например, в скорости свертывания или стабильности) всегда уступают так называемым регулярным участкам. Поэтому классификация гетерогенных белковых фрагментов на регулярные и нерегулярные, с моей точки зрения, нецелесообразна. Такое разделение разрушает естественную гармонию сложной сети тонких внутримолекулярных взаимодействий и не адекватно с физической точки зрения как реальной картине сил, стабилизирующих нативную конформацию, так и эволюционно отобранному спонтанному механизму сборки аминокислотной последовательности. Отделение регулярных участков от нерегулярных, забвение последних, идеализация первых и последующая манипуляция только с ними создают ложное представление о возможности упрощения проблемы и о якобы открывающемся в этой связи подходе к ее решению.

Концепция о доминирующем значении регулярных вторичных структур (начало 1950-х годов) и супервторичных структур (начало 1970-х годов) никогда не была подкреплена ни строгим доказательством, ни даже просто убедительными доводами. К последним трудно отнести утверждение об особой роли в стабилизации структуры белка пептидных водородных связей, если учесть имеющиеся экспериментальные данные и принять во внимание то обстоятельство, что свертывание белковой цепи происходит в водной среде. Несостоятельность схемы Шульца и Ширмера заключается не только в том, что в ней не учитывается значительная доля аминокислотных остатков в создании белковой структуры. Конечно, трудно, но можно было бы объяснить (привлекая, например, в качестве аналогии кристаллизацию перенасыщенного раствора под действием затравки), почему ответственными за построение нативной конформации, в частности α -химотрипсина, являются лишь 27% остатков, а С-концевого домена папаина и того меньше — только 7%. Однако рассматриваемые концепция и схема остались бы столь же ошибочными, даже если увеличить содержание вторичных структур в несколько раз.

В обоих случаях основополагающим является предположение, что вторичные структуры энергетически более предпочтительны и их образование и последующее образование из них более сложных структур должны всегда быть опережающими по сравнению с образованием всех других форм. Именно по этой причине нерегулярные участки белка не нашли себе места в схеме Шульца и Ширмера. Такое предположение неправильно по отношению к α -спиралям и еще в большей степени к β -структурам. Расчеты показали, что β -тяжи не являются стабильными образованиями в создании β -складчатых листов и β -супервторичных структур и играют пассивную или второстепенную роль. Активную функцию выполняет промежуточный нерегулярный участок, который сближает два флуктуирующих фрагмента цепи, имеющих склонность к образованию вытянутых форм. Этот участок

является конформационно более жестким и энергетически более предпочтительным, чем β -тяжи, и, следовательно, имеет большую скорость формообразования. Игнорирование в структурной организации нерегулярных участков неправильно также с термодинамической точки зрения. Концепция вторичных структур и схема Шульца и Ширмера не выдерживают и кинетической проверки. Расстояние между вторичными структурами (супервторичными структурами и доменами) в белках часто бывает столь большим, что объяснить их сближенность и сборку всей конформации белка за приемлемый в биологической шкале времени период можно только допустив образование промежуточных конформационно жестких нерегулярных областей.

Пространственное строение глобулярных белков иррегулярно, поскольку отсутствует гомогенность в его химическом строении. Химическая гетерогенность белковой последовательности определяется расположением боковых цепей. Взаимодействия боковых цепей друг с другом и с пептидными группами в силу их многочисленности превалируют над взаимодействиями элементов основной цепи, и поэтому они могут определять выбор структуры последней из представительного набора приемлемых для нее конформационных состояний, некоторые из которых близки к регулярным. Следовательно, реализуемая пространственная структура белковой молекулы есть результат сложения неодинаковых по своему воздействию на процесс структурообразования сил, как правило, более мощных сил взаимодействия нерегулярно расположенных в последовательности и обладающих большой конформационной свободой боковых цепей и более слабых сил взаимодействия элементов регулярной полипептидной цепи. Убедительным подтверждением именно такого соотношения между энергетическими вкладами боковых заместителей и пептидного остова в стабилизацию структуры белка служит прежде всего факт огромного конформационного разнообразия белковых молекул, имеющих одинаковую основную цепь и разное расположение стандартных боковых цепей.

Утверждение о том, что за укладку боковой цепи в нативную конформацию ответственны только вторичные и супервторичные структуры, а остальная часть пассивна в этом процессе и лишь обеспечивает взаимодействия регулярных участков или подстраивается к ним, равносильно утверждению о значительно большей эффективности и решающей роли взаимодействий элементов основной цепи или утверждению о неизменно регулярном характере взаимодействий боковых цепей. Очевидно, то и другое несостоятельно. Первое — поскольку основная цепь включает менее одной трети атомов белковой молекулы, а второе — из-за гетерогенной аминокислотной последовательности.

9.3. КОМБИНИРОВАННЫЙ ПОДХОД К ПРЕДСКАЗАНИЮ ТРЕХМЕРНОЙ СТРУКТУРЫ БЕЛКА

Работа Левитта и Чотиа [218] по классификации пространственных структур глобулярных белков на четыре группы (α , β , $\alpha + \beta$, α/β), оказалась ценной для специалистов, разрабатывающих алгоритмы предсказаний α -спиралей и β -складчатых листов. Между тем в этой работе не было сделано открытий, не была затронута суть проблемы укладки белковой цепи в нативную конформацию и даже не предлагался новый метод классификации вторичных структур или усовершенствование существующих. Авторы сделали чисто формальное и бесспорное схематическое представление α -спиралей и β -структур в трех десятках белков. И тем не менее, работа стимулировала поток новых исследований, не иссякающий и поныне [166, 239—250]. Причина такого сильного резонанса заключается, вероятно, в ее чисто психологическом эффекте. М. Левитт и С. Чотиа как бы предложили отложить на время нерешаемую десятилетиями задачу по идентификации вторичных структур и заняться новой, на первый взгляд, более легко решаемой и ближе стоящей к конечной цели задачей, а именно укладкой белковой цепи в нативную конформацию, подобно тому как это делали О.Б. Птицын и А.А. Рашин [103, 104], а еще раньше А. Гуццо [61] с α -спиральными цилиндрами.

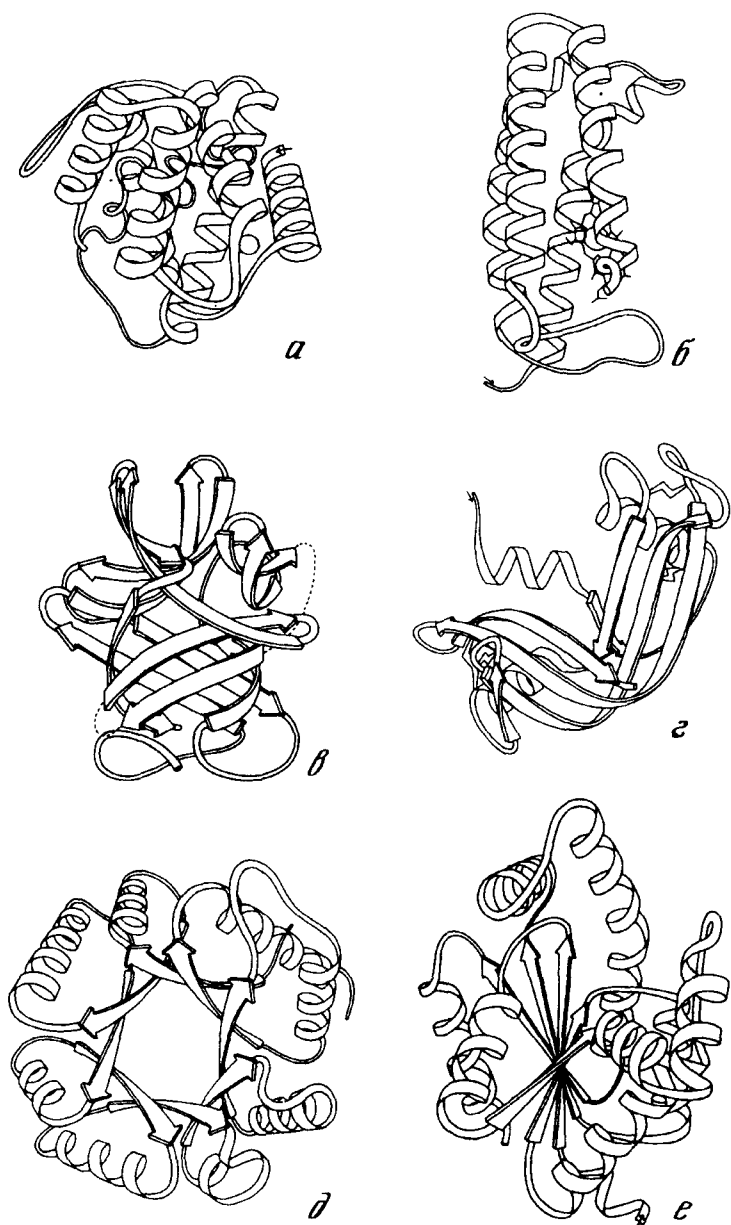
В связи с тем, что существуют группы белков с преимущественным содержанием α -спиралей и β -структур, можно изучать их пространственную организацию, или вовсе не предсказывая конформационных состояний отдельных остатков, что не удастся делать правильно, а беря вторичные структуры прямо из опыта, или оценивая брутто содержание последних с помощью известных статистических методов, что автоматически увеличивает точность предсказания на несколько десятков процентов, поскольку в этом случае приходится идентифицировать состояния не 20 аминокислотных остатков, а лишь трех-четырёх структурных групп Левитта и Чотиа. При изменении постановки задачи и неизбежном снижении требований к ожидаемой информации появляется возможность решения других вопросов, правда, менее важных. Например, можно сфокусировать внимание на определении общего процентного содержания аминокислотных остатков в последовательности, находящихся в α - и β -областях, и полученные результаты сравнивать с аналогичными данными спектральных методов. Можно поставить вопрос о том, каков порядок взаимодействий вторичных структур друг с другом и какие в принципе возможны способы укладки α -спиралей относительно β -структур и последних друг относительно друга, и о частоте их встречаемости в белках. Можно, наконец, разрабатывать новые предсказательные алгоритмы, классифицирующие белки по группам (α), (β), ($\alpha + \beta$) и (α/β). Подобные вопросы, до работы Левитта и Чотиа, представлялись частными случаями. Теперь же анализ укладки, например, полипептидной цепи апомиоглобина — это уже исследование белка, не случайно взятого из множества других, а планомер-

ное изучение типичного представителя целой группы белков класса (α).

Как прежде из анализа первичных и третичных структур белков выводились зависимости и правила упаковки отдельных аминокислотных остатков во вторичные структуры, так теперь стали изучать направления свертывания полипептидных цепей в высокорегулярных белках, анализировать контактные поверхности между сближенными участками α -спиралей и β -структур и выводить правила упаковки отдельных вторичных структур в супервторичные. Последние не могли не вызвать к себе повышенного интереса, поскольку, согласно Г. Фасману, выражающему в данном случае господствующее мнение: "Супервторичные структуры являются главными компонентами доменов, которые при взаимодействии образуют трехмерные конформации белков" [238. С. 236]. Существенно, однако, то обстоятельство, что изучение более высоких уровней структурной организации белков стало проводиться не после решения задачи о формировании практически неограниченного количества нерегулярных структурных элементов на локальных участках аминокислотной последовательности и у целых белковых молекул, и даже не после выяснения причин образования самих α -спиралей и β -структур и выработки надежных правил их идентификации. Все эти задачи так и остались нерешенными. По-прежнему сохранился чисто эмпирический подход, дополнившийся еще более упрощенным представлением трехмерных структур белковых молекул. Возник даже особый вид сюрреалистической белковой графики (рис. П.9), а позднее, с появлением цветных мониторов и принтеров, — живописи [251—254].

Шаг сделан не в сторону осмысления явления или получения новых фактов; произошло лишь смещение акцентов с вторичных структур на супервторичные структуры и домены как их комбинации. Это был логически неоправданный шаг в сторону от решения проблемы, не являющийся естественным переходом от понятого простого к познанию на такой основе более сложного. Чрезмерное увлечение в последние годы только высшими и еще реже встречающимися уровнями регулярных структур белковых молекул, по существу, есть отказ от решения частных задач и попытка решить теми же средствами более сложные и еще более частные. В работах С. Чотиа [255—257], М. Левитта [258—260], Ф. Козна [261—263], С. Козна [264], Г. Фасмана [265], М. Стернберга [140—145] и их соавторов, а также ряда других исследователей разрабатываются эмпирические правила упаковки вторичных структур, нахождения областей инициации свертывания, отнесения белков к одной из групп Левитта и Чотиа, выяснения топологии цепи и т.д. Главными направлениями, рассматриваемыми ниже, становятся сборка преформированных вторичных структур в супервторичные и третичные и классификация белков на группы (α), (β), ($\alpha+\beta$) и (α/β).

Одной из первых работ, использовавших иерархический подход к предсказанию пространственного строения белков, является исследование Р. Ричмонда и Ф. Рихардса [266]. Авторы проанализировали все



Р и с. II.9. Схематическое представление трехмерных структур термолитина (домен II) и цитохрома с (*a,b*; структурная группа α), трипсинового ингибитора соевых бобов и рибонуклеазы А (*c,d*; группа β), пируваткиназы (домен I) и аденилаткиназы (*e,f*; группа α/β) [253]

возможные способы ($\sim 3 \cdot 10^8$) ассоциации шести главных α -спиралей миоглобина (всего в белке восемь α -спиральных участков, включающих от 7 до 23 аминокислотных остатков), приняв их конформации такими же, какими они были определены рентгеноструктурным анализом. Из рассчитанных комбинаций известных структурных элементов найдено две, удовлетворяющие плотной упаковке, непрерывности цепи и геометрическим условиям встройки гема. Подобный подход, также для миоглобина и с тем же успехом (среднеквадратичное отклонение атомов C^α составило $\sim 4,5 \text{ \AA}$), был использован Ф. Коэном и соавт. [267, 268].

Вскоре анализ супервторичных и третичных структур стал широко использоваться для исследования топологии полипептидной цепи у белков, содержащих β -складчатые листы (группа β) и смежные вторичные структуры (группы $\alpha + \beta$ и α/β). М. Стернберг и соавт. [269] проанализировали структурные мотивы у 13 гликолитических ферментов, десять из которых были ранее изучены кристаллографически. Показано, что пространственное строение молекул всех ферментов представляет собой вариации одной структурной темы — многотяжевой, преимущественно параллельной β -складчатой структуре, экранированной от контактов с растворителем α -спиралями (группа α/β). У некоторых ферментов наблюдается также структурное подобие доменов, правда, оно неярко выражено.

Ф. Коэном и соавт. [261—263] развит ступенчатый метод предсказания трехмерной структуры белка по известной аминокислотной последовательности. Метод, получивший название комбинированного, предусматривает проведение трех последовательных стадий: 1) предсказание на основе существующих алгоритмов регулярных вторичных структур; 2) упаковку α -спиралей и β -складчатых листов в конформацию, отражающую характерные особенности нативной структуры; 3) энергетический расчет отобранных конформаций с использованием моделей, подобных сверхупрощенным моделям Левитта [254], Кунтца и соавт. [155], Робсона и Осгудорпа [270]. План исследования на первый взгляд выглядит логично. В действительности же он нереален, причем нереален в отношении всех своих трех положений, что следовало из данных, уже имевшихся к моменту его появления. Первый пункт плана невыполним по крайней мере по трем причинам. Во-первых, у большей части белков вторичные структуры составляют незначительную долю трехмерной структуры, а в среднем в α -спирали входит 25—30% остатков, а в β -структуры — 15—20%. Во-вторых, встречающиеся в конформациях белков вторичные структуры, как правило, сильно искажены и лишь условно могут быть отнесены к регулярным (рис. II.3). В-третьих, надежность существующих алгоритмов предсказания вторичных структур не превышает 50% (гл. 8), что исключает их практическое использование. Возможно, по этим или иным причинам авторы не стали обращаться к предсказательным алгоритмам, а приступили к реализации второго пункта своего плана, выбрав для демонстрации возможностей предлагаемого ими метода белки, изученные рентгеноструктурно, и взяв всю информацию о геометрии

вторичных структур непосредственно из эксперимента [261—263]. Они рассмотрели все способы упаковки β -структурных сэндвичей в 11 иммуноглобулиновых доменах, содержащих от шести до девяти β -складчатых листов. Для каждого домена рассчитано порядка 10^7 — 10^8 различных сочетаний опытных вторичных структур. Количество вариантов, отобранных для нахождения структур, напоминающих соответствующие кристаллографические конформации доменов, составило от нескольких единиц до 4 тыс. комбинаций. Наименьшее среднеквадратичное отклонение атомов C^α оказалось равным 5,0 Å. Эта цифра, учитывая небольшие размеры доменов (34—53 остатка) и использование в расчете значительного экспериментального материала, свидетельствует о несостоятельности метода и, в частности его второй позиции.

Аналогичная задача, отвечающая второй стадии комбинированного метода, решалась еще в 1975 г. А. Бэржесом и Г. Шерагой [139] на примере панкреатического трипсинового ингибитора, где также отнесения конформационных состояний остатков были сделаны не с помощью эмпирических корреляций, а на основе кристаллографической структуры молекул. Оказалось, что рассчитанная с использованием такого идеального алгоритма предсказания, каким является эксперимент, конформация белка даже отдаленно не напоминала его нативную структуру (подробнее см. раздел 8.3).

Таким образом, попытки уложить вторичные структуры в супервторичные и получить грубое приближение нативной конформации белка (второй этап комбинированного подхода), полагая успешно проведенным первый этап и считая известными не только α -спирали и β -структуры, но даже конформационные состояния всех остатков в цепи, сталкиваются с непреодолимыми трудностями. Они возникают из-за сложного профиля многомерной потенциальной поверхности белковой глобулы, обуславливающей невозможность (если следовать предложенным Ф. Коэном, М. Стернбергом и У. Тейлором путем) определения структуры, отвечающей глобальному минимуму энергии. Цель не может быть достигнута и на третьем этапе, при использовании найденных ранее структур в качестве нулевых приближений для сверхупрощенных моделей. Вывод о несостоятельности таких моделей детально обосновывается в главе 10.

Развитый в работах Ф. Коэна, М. Стернберга и соавторов подход не опирается на общую физическую теорию и единый метод расчета, устанавливающие прямые логические и количественные связи между аминокислотной последовательностью белка и координатами атомов нативной конформации молекулы [261—263, 269—274]. Каждая стадия комбинированного подхода следует своим эмпирическим правилам, корреляционным соотношениям, предсказательным алгоритмам и методологическим приемам. Объединяющим и усложняющим все его составные части началом служит традиционное, сложившееся еще в 1950-е годы, представление о пространственной организации белковой глобулы в виде ансамбля регулярных, вторичных структур (концепция Полинга и Кори) с внутренним гидрофобным ядром и внешней

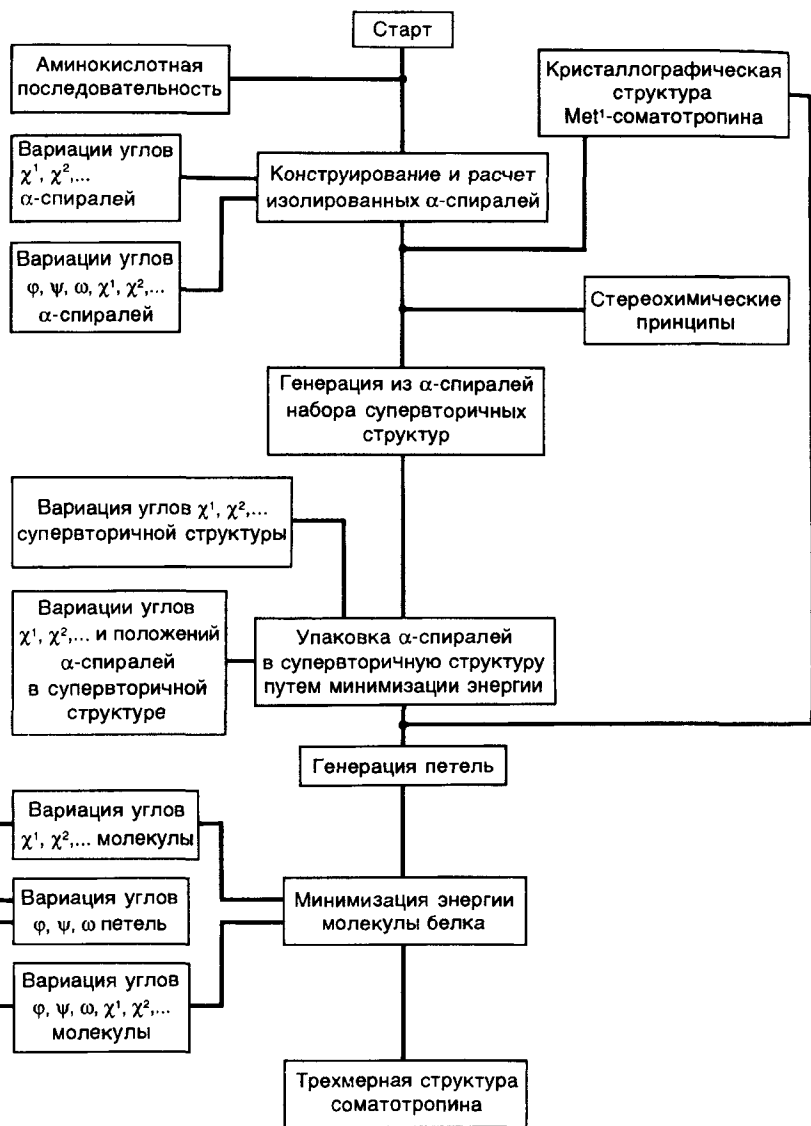
гидрофильной оболочкой (концепция Козмана). Подход к предсказанию трехмерных структур ограничен кругом белков, обладающих значительным содержанием α -спиралей и β -складчатых листов. Но и здесь он не является, как в отношении геометрии белковой молекулы, так и ее структурной организации, предсказательным в истинном смысле этого слова, поскольку при его использовании главная структурная информация заимствуется из эксперимента, прежде всего из данных рентгеноструктурного анализа. В результате комбинированный подход не может привести к получению качественно новых данных о конформационных свойствах белковых молекул и помочь проникнуть в область непознанного. По существу, он является средством копирования известных кристаллографических структур. Такое занятие не лишено смысла, тем более, что копируемыми объектами являются произведения самой Природы. Однако в данном случае положительных результатов принципиального характера ждать не приходится, поскольку, во-первых, цель сведена к сугубо частной задаче, касающейся небольшой группы белков с супервторичными структурами и, во-вторых, эта задача не поддается решению из-за невозможности предсказать вторичные структуры с 100%-ной надежностью и точной геометрией и, кроме того, полного игнорирования нерегулярных участков белковой цепи и отсутствия идей и методов количественной оценки их конформационных состояний.

В 1980—1990-е годы комбинированный подход (его также стали называть иерархическим) получил широкое распространение. Он начал использоваться для предсказания трехмерных структур белков и для отнесения их к структурным группам Левитта и Чотиа. Десятки проведенных в рамках этого подхода исследований идейно близки и отличаются друг от друга анализируемыми объектами и структурными мотивами супервторичных образований, а также характером предположений, трудноконтролируемых опытом, и объемом привлекаемого экспериментального материала. Все попытки предсказать супервторичные структуры, не используя данные рентгеноструктурного анализа, заканчиваются неудачно.

Ф. Коэн и соавт. [275] развили комбинированный метод предсказания третичной структуры в сочетании со спектрами КД и использовали его для установления строения α -субъединицы триптофансинтетазы. Содержание вторичной структуры было определено спектрально, а места ее локализации в последовательности — с помощью собственного алгоритма [272]. Установленная пространственная структура белка отнесена к группе (α/β) и представлена в виде β -складчатого листа, окруженного с обеих сторон α -спиралями. Результат, однако, противоречит данным рентгеноструктурного анализа Д. Девиса и С. Хайда, цитируемых в работе [275]. На самом деле трехмерная структура α -субъединицы триптофансинтетазы, хотя и содержит α -спирали и β -складчатые листы, но обладает совершенно иной супервторичной структурой. По такой же схеме Ф. Коэн и соавт. [276] исследовали пространственное строение интерлейкина 2, спектры КД которого указывают на принадлежность белка к α -группе. Всего

было рассмотрено $3,9 \cdot 10^4$ вариантов супервторичной структуры из α -спиралей. Из них 27 конформаций удовлетворяли стереохимическим правилам и условию образования дисульфидной связи между Cys-58 и Cys-105. Они были разделены на пять различных структурных категорий, содержащих пучки из четырех α -спиралей, закрученные вправо. Согласно кристаллографической структуре интерлейкина 2, полученной вскоре Б. Брандхубером и соавт. [277] с разрешением 3,0 Å, белок, действительно, состоит из антипараллельных α -спиральных узлов, упаковка которых, однако, существенно отличается от предсказанной [276] и наблюдаемой ранее у нескольких других белков [253]. Ф. Коэн и И. Кунтц [278] предприняли попытку предсказать трехмерную структуру белкового гормона роста человека, не прибегая к данным рентгеноструктурного анализа и максимально используя на всех этапах исследования корреляционные статистические соотношения, а также расчет структурных вариантов гипотетических супервторичных структур. Из спектров КД было установлено наличие 45—50% α -спиралей и отсутствие β -структуры. Поэтому белок, состоящий из двух доменов, был отнесен к группе (α). Далее анализируется фактически не пространственное строение молекулы, а только ее регулярная часть. Вторая же половина гормона, которая включает 50—55% остатков, остается вне внимания авторов.

Считается, что часть нерегулярных участков предназначена для образования сближающих α -спираль β -изгибов, последовательности которых, но не их конкретная геометрия, идентифицируются с помощью алгоритма, разработанного при изучении взаимодействий в глобулярных белках α -спиралей с β -складчатым листом [263]. Сами спирали и их границы предсказываются, используя алгоритмы, в которых особое значение в инициации, формировании и обрыве спиралей придается гидрофобным остаткам [263, 266, 278, 279]. Поскольку точность использованных алгоритмов предсказания невелика, разбиение последовательности на регулярные и нерегулярные участки является ориентировочным. Однако в дальнейшем анализе оно остается неизменным. Затем рассматриваются спираль-спиральные взаимодействия с помощью так называемого спираль-упаковочного алгоритма [271]. В результате выделяются три вида супервторичных структур, области контактов α -спиралей в которых локализуются методом Р. Ричмонда и Ф. Рихардса [266] с привлечением стереохимических правил. Этот перечень последовательных манипуляций завершается повторным обращением к спираль-упаковочному алгоритму [271], контролем межатомных расстояний [196, 273, 280, 281], использованием эмпирического отношения площади поверхности глобулы к ее объему [282] и оценкой стабилизирующих дипольных взаимодействий спиралей в супервторичных структурах [283]. Было рассчитано всего 10^8 структурных вариантов супервторичной структуры белкового гормона [278]. Из них финиша достигли пять структур, представляющих собой правоскрученные пучки из четырех α -спиралей. Проверить результаты работы путем непосредственного сопоставления с данными опытной структуры гормона роста человека пока не представ-



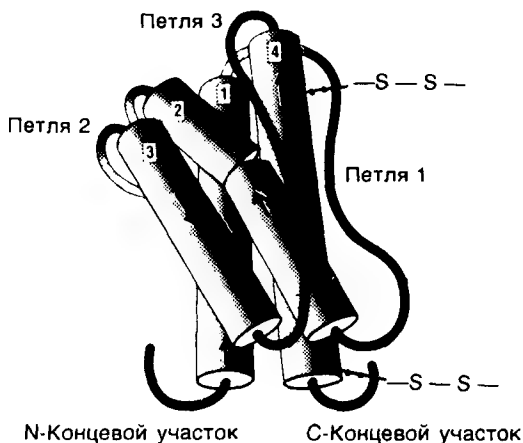
Р и с. II.10. Схема комбинированного подхода к предсказанию трехмерной структуры бычьего Met¹-соматотропина [285]

ляется возможным. Однако известна кристаллографическая трехмерная структура молекулы гомологичного белка — гормона роста свиньи [284]. Она существенно отличается от всех найденных Козном и Кунтцем структурных вариантов тем, что содержит суперспираль из четырех антипараллельных α-спиралей, закрученных не вправо, а влево.

Наиболее строго комбинированному или иерархическому подходу следуют Л. Карласси и соавт. [285], использующие его возможности для предсказания трехмерной структуры бычьего соматотропина — белка из 191 остатка, известного также как гормон роста. Схема исследования, представленная на рис. II.10, включает пять этапов: 1) конструирование и расчет изолированных вторичных структур; 2) генерация возможных наборов супервторичных структур; 3) упаковка вторичных структур в супервторичные путем минимизации энергии; 4) генерация промежуточных нерегулярных участков; 5) минимизация конформационной энергии всей молекулы белка. Для оценки реальных возможностей комбинированного подхода кратко остановимся на содержании этих этапов. Решающую роль в исследовании пространственного строения бычьего соматотропина сыграла информация о кристаллографической структуре Met¹-соматотропина свиньи [285]. Оба белка имеют чрезвычайно высокую гомологию (> 90%), выполняют одну функцию, и поэтому нет сомнения в совпадении их трехмерных структур. Хотя авторам, как они пишут, не были известны координаты атомов молекулы Met¹-соматотропина, но они обладали полным представлением обо всех α -спиралях, способе их упаковки в суперспираль и шейках основных цепей всех нерегулярных участков (рис. II.11) [285]. Таким образом, в этой работе не было проблем с локализацией в аминокислотной последовательности регулярных и нерегулярных структур, их взаимной ориентации и многими другими аспектами пространственного строения белка. На первом этапе проблемы возникли с количественным анализом конформационных состояний остатков в четырех α -спиралях. Потребовалось формирование нулевых приближений для минимизации энергии при вариации двухгранных углов φ, ψ, ω основной цепи и углов $\chi^1, \chi^2, \dots$ боковых цепей остатков. Для основных цепей спиралей выбираются значения φ, ψ, ω , рассчитанные Чоу и соавт. [286] для α -спирали поли-L-аланина ($-68, -38, 180^\circ$), а для боковых цепей — значения самых низкоэнергетических конформаций в R-форме соответствующих метиламидов N-ацетил- α -аминокислот [287]. Задача решается в две стадии. Сначала минимизируется энергия при вариации только углов боковых цепей, а затем — всех двухгранных углов каждой α -спирали. Можно утверждать, что использованные авторами процедуры выбора нулевых приближений и способ минимизации энергии не ведут к реальным значениям двухгранных углов основных и боковых цепей [285]. Приведем лишь один аргумент в пользу такого заключения.

Известно, что один стандартный аминокислотный остаток имеет в среднем около 10 низкоэнергетических конформационных состояний, отвечающих оптимальным формам соответствующих монопептидов и наблюдающихся в структурах белковых молекул. При фиксации углов φ, ψ в области α -спирали (R) число таких состояний уменьшается не менее чем до 4. В α -спирали соматотропина входят 28, 22, 23 и 31 аминокислотных остатков. Следовательно, количество структурных вариантов для минимизации энергии, составленных только из предпочтительных для α -спиралей ориентаций белковых цепей, будет

Р и с. П.11. Схематическое представление трехмерной структуры Met¹-соматотропина свиньи [284]



не меньше, чем соответственно 4^{28} , 4^{22} , 4^{23} и 4^{31} . Из этого огромного количества возможных конформационных состояний Карласси и соавт. [285] выбирают для каждой спирали лишь одно состояние. Аргументы в пользу такого выбора несостоятельны, так как углы ϕ , ψ поли-*L*-аланина могут на многие десятки, вплоть до сотни, градусов отличаться от углов спиральных остатков в белковой цепи (рис. П.3), а углы χ^1 , χ^2 ,... аминокислотных остатков белка могут не иметь ничего общего с углами χ^1 , χ^2 ,... самых лучших конформаций изолированных монопептидов. Причем минимизация энергии при одновременной вариации большого числа переменных (например, у спирали 4 соматотропина их больше 160) не является эффективной даже для одного варианта. Таким образом, после первого этапа исследования пространственного строения бычьего соматотропина (рис. П.10) были получены конформации четырех спиралей со случайными ориентациями боковых цепей и произвольными значениями углов основных цепей, попадающих в спиральную область (R).

Второй этап исследования, посвященный выяснению взаимного расположения спиралей, несложно пройти, зная кристаллографическую структуру Met¹-соматотропина (рис. П.11). Естественно, из многочисленного набора всевозможных вариантов супервторичных структур предпочтение было отдано опытной структуре, представляющей собой левую суперспираль из четырех α -спиралей, контактирующих друг с другом боковыми цепями гидрофобных остатков.

Уточнение выбранной супервторичной структуры составило содержание третьего этапа. Оно заключалось в минимизации энергии с помощью методов, изложенных в работах [288, 289]. Расчет, как и на первом этапе, проводился в две стадии. Сначала варьировались двухгранные углы только боковых цепей всех спиралей, что преследовало цель исключить наталкивание остатков сближенных вторичных структур. На второй стадии минимизации энергии углы основных цепей спиралей по-прежнему оставались фиксированными, а

изменялись углы боковых цепей и дополнительно введенные шесть переменных, координирующих положение спирали как твердого тела. Три новые переменные определяли координаты центра оси каждой спирали, а три другие, эйлеровские углы, — ее ориентацию. Как бы ни производился последующий расчет и какие бы при этом ни использовались совершенные методы минимизации, то, что уже было заложено в исходные модельные приближения, исключает получение объективных результатов. К упаковке белковой цепи в супервторичную структуру белка авторы подошли с четырьмя α -спиралями, имеющими, как оказалось, случайные ориентации боковых цепей и также случайные, но только в пределах одной области R, значения двугранных углов основной цепи [285]. Последние при минимизации на третьем и последующих этапах закрепляются и, следовательно, остаются в окончательной структуре белка. Что касается боковых цепей, то расчет пакета α -спиралей с вариацией углов $\chi^1, \chi^2, \dots$ ничего существенного во взаимном расположении остатков взаимодействующих спиралей изменить не может, поскольку при минимизации энергии углы меняются только в пределах своих локальных минимумов, заданных исходными приближениями. Поэтому двугранные углы боковых цепей спиральных остатков в супервторичной структуре остаются такими же случайными, какими они были в изолированных спиралях.

Столь же достоверны результаты исследования конформаций нерегулярных участков (этап 4), которые включают 40 (петля 1), 9 (петля 2) и 24 (петля 3) аминокислотных остатков. Кроме того, нерегулярными участками являются N-концевая последовательность из шести остатков и C-концевая — из восьми (рис. II.11). Итого, около 45% остатков не входит во вторичные структуры. Исходные для минимизации конформационные варианты нерегулярных фрагментов генерировались таким образом, чтобы их геометрические мотивы приближались к пептидному скелету кристаллической структуры Met¹-соматотропина и при этом выдерживались определенные расстояния, присущие супервторичной структуре, в частности, расстояние между двумя парами остатков Cys, образующих дисульфидные связи. Предпринятая авторами попытка пойти дальше наблюдаемой структуры и рассчитать конформационные состояния остатков нерегулярной части белка заканчивается, как и в аналогичных случаях с конкретизацией до атомного уровня геометрии спиралей и суперспиралей, неудачей [285]. При комбинированном подходе и, прежде всего, при использовании методики формирования нулевых приближений иного результата быть не может.

Количество исходных для минимизации конформаций пяти нерегулярных участков (трех петель и двух концевых фрагментов), составленных только из низкоэнергетических состояний свободных остатков, ориентировочно имеет порядок 10^{40} , 10^9 , 10^{24} , 10^6 и 10^8 . Если даже предположить, что только десятые или сотые доли процента такого астрономического количества смогут удовлетворять условиям их встройки в кристаллографическую структуру белка, то и в этом случае

расчет нерасален и нереально получение объективных количественных данных о пространственном строении нерегулярных участков с использованием экспериментальной информации. Рассмотренные на четвертом этапе 10^3 структурных вариантов петель являются практически бесконечно малой долей возможных конформационных состояний трех нерегулярных участков соматотропина. Шесть конформаций из этой тысячи стали объектами дальнейшего исследования на уровне всего белка, которое заключалось в минимизации энергии. Расчет проведен в три стадии с последовательным варьированием сначала двугранных углов боковых цепей молекулы, затем углов основных цепей петель и, наконец, всех углов одновременно. Самая низкоэнергетическая конформация из шести рассчитанных была признана трехмерной структурой соматотропина. По мнению авторов, найденная ими структура является предсказанной [285]. Такое мнение, очевидно, не соответствует действительности и может вызвать недоумение. Чтобы предсказать структуру теоретически, необходимо дать ее независимое описание (если она известна) или заранее предвидеть ее особенности (если она еще неизвестна). Иными словами, исследование, претендующее на предсказание результатов, должно непременно содержать элементы априорности и приоритетности их получения. Ни того, ни другого в рассматриваемой работе нет. Найденная конформация белковой молекулы случайна во всех своих составных частях: α -спиралях, супервторичной структуре и нерегулярных участках последовательности. Сближает ее с нативной конформацией белка лишь внешнее сходство, достигнутое исключительно благодаря использованию данных рентгеноструктурного анализа. Однако оно имеет сугубо формальный характер и отнюдь не свидетельствует о достоверности "предсказанной" конформации, так как сравниваются структуры разных уровней организации, связь между которыми не однозначна. Ситуация здесь в принципе такая же, как при сопоставлении двух структур одного белка, полученных, в первом случае, из анализа сотен дифракционных рефлексов, а во втором, — десятков тысяч, т.е. с существенно разным разрешением, например, 6,0 и 1,5 Å. Первой структуре может соответствовать множество гипотетических структур атомного разрешения порядка 1,5 Å, имеющих одну топологию белковой цепи, но отличающихся конформационными состояниями всех остатков. Для выявления из этого множества единственной структуры, совпадающей с экспериментальной структурой того же порядка разрешения ($\sim 1,5$ Å), требуется не комбинированный (иерархический) подход, а строгая физическая теория структурной организации белка и совершенно иной метод расчета.

ПЕРСПЕКТИВЫ ЭМПИРИЧЕСКОГО ПОДХОДА

Для всех эмпирических методов предсказания регулярных форм основной цепи на локальных участках аминокислотной последовательности, образования из этих форм супервторичных структур, доменов и трехмерных структур белковых молекул (с момента их появления и по сегодняшний день) характерны следующие черты принципиального порядка. Прежде всего, в основе всех исследований этого направления лежит конформационная концепция Полинга и Кори, согласно которой трехмерная структура белка представляет собой ансамбль регулярных, вторичных структур. Единство эмпирических методов предсказания по отношению к этой концепции неизбежно, поскольку в противном случае становится бесперспективным поиск эмпирических корреляций. Очевидно, если пространственное строение сложных макромолекул состоит не из отдельных немногочисленных стандартных блоков, а включает неограниченное количество разнообразных нерегулярных структурных сегментов, то нельзя рассчитывать на его описание с помощью простых правил, выведенных путем статистической обработки экспериментального материала, всегда крайне ограниченного в решении данной задачи. В первых работах предполагалось, что пространственное строение глобулярных белков почти сплошь состоит из вторичной структуры одного типа — α -спирали. Позднее к вторичным структурам был отнесен β -складчатый лист, а затем β -изгиб и недавно Ω -петли. Привлечение последних двух означало принципиальный отход от строгого определения понятия вторичной структуры, так как β -изгиб и Ω -петли не являются регулярными формами. Кроме того, их идентификация отличается от идентификации α -спиралей и β -структур по получаемой при этом информации о структуре белка. Если предсказание регулярной структуры в идеале означает определение на отдельном участке белковой цепи конформационных состояний составляющих его остатков, точнее, геометрии основной цепи участка, то предсказание изгибов и петель даже в идеале означает лишь утверждение об изменении направления цепи, причем, если это касается β -изгибов, даже не на 180° , а лишь на угол больше 90° ; для петель и такое ограничение отсутствует. Это связано с тем, что β -изгибы и Ω -петли могут быть реализованы путем практически неограниченного количества различных форм основной цепи, а каждая форма — набором большого числа конформационных состояний остатков. Излишне говорить, что между β -изгибами и Ω -петлями нет четких границ.

Обратим внимание еще раз на отсутствие соответствия принимаемой в работах концепции о пространственной организации белковых молекул имеющимся опытным данным об их трехмерных структурах. По оценкам различных авторов, общее среднее содержание в третичных структурах α -спиралей и β -структур не превышает 50%. Имеются белки с более высоким содержанием регулярных форм и белки, в которых они практически отсутствуют. Хотя по отношению к

структуре белков понятие среднего содержания вторичных структур не имеет физического смысла, тем не менее напомним, что приведенное значение (~ 50%) сильно завышено. Данное обстоятельство указывает на то, что вторичные и супервторичные структуры, т.е. регулярные формы и их комбинации, не являются для белков фундаментальными структурными субъединицами. Следовательно, любая конформационная теория, исходящая из наличия только α -спиралей и β -структур, будет в лучшем случае иметь частный характер.

Таким образом, существующий экспериментальный материал свидетельствует о несостоятельности традиционного представления о пространственном строении глобулярных белков как о наборе регулярных структур. Подобное представление, возникшее в начальный период структурных исследований белков (1930—1950-е годы), оказалось справедливым лишь по отношению к регулярным компонентам фибриллярных белков и ограниченной группе глобулярных белков. Большая часть белковых молекул существенно иррегулярна. Поэтому столь распространенное разделение пространственного строения белка на вторичные и третичную структуры, предложенное в 1952 г. Линдерстрем-Лангом [3], или на вторичные, супервторичные, доменные и третичные структуры, предложенное в 1979 г. Шульцем и Ширмером [157], строго говоря, лишено общности, что делает бесплодным поиск простых эмпирических корреляций между регулярными формами основной цепи и аминокислотной последовательностью.

Другая общая для рассматриваемых исследований черта состоит в стремлении избежать, или крайне упростить анализ взаимодействий даже между соседними по цепи остатками. При корреляционном подходе это также неизбежно, поскольку признание значительной роли межостаточных взаимодействий в формировании структуры белка равносильно отказу от поиска эмпирических зависимостей. Действительно, при огромном множестве комбинаций как природных аминокислот в последовательности, так и конформационных состояний каждого остатка количество подлежащих рассмотрению вариантов структур даже на малых олигопептидных участках боковой цепи столь велико, что для их корректного статистического анализа недостаточно опытных данных о структурах всех имеющихся в природе белков. В этом заключается еще одна принципиальная ограниченность статистического подхода к исследованию пространственного строения белков. Она также не оставляет никаких надежд на возможность решения эмпирическим путем структурной проблемы белка в будущем при накоплении большого экспериментального материала, как это предполагают вслед за Максфилд и Шерагой многие исследователи [134]. Далее, во всех работах этого направления при обсуждении пространственного строения белка подразумевается лишь конфигурация полипептидной цепи.

Ни в одном исследовании вопросы, касающиеся конформационных состояний боковых цепей, составляющих по числу атомов две трети всей белковой молекулы, их взаимообусловленности и влияния на форму основной цепи, не только не решаются, но по существу не ставятся.

Между тем у эволюционно отобранной, гетерогенной аминокислотной последовательности именно взаимодействия боковых цепей между собой и с элементами основной цепи приводят к резкой энергетической дифференциации вероятных конформационных состояний макромолекулы и делают возможным выделение из их огромного количества наиболее стабильной, строго определенной нативной трехмерной структуры белка. В силу этого обстоятельства на локальных участках белковой цепи в зависимости от ее аминокислотного порядка возможна реализация разнообразных структур, главным образом нерегулярных.

Представление о том, что у гетерогенной полипептидной цепи наиболее компактными, энергетически предпочтительными во всех случаях оказываются только регулярные структуры, не подкрепляется физическими соображениями, противоречит экспериментальным данным и результатам теоретического конформационного анализа. Такое представление нельзя объяснить соображениями общего характера. Часто встречаемые в природе регулярность и простота форм всегда обусловлены физическими причинами, стремлением обрести минимальную свободную энергию. У монокристалла, например, высокая симметрия элементарной ячейки представляет наилучшие условия идентичным молекулам для образования между ними наибольшего количества стабилизирующих контактов и, следовательно, возможность иметь наименьшую энергию; у жидкости шаровая форма капель обладает минимальной поверхностью и, соответственно, наименьшей энергией поверхностного натяжения и т.д. У белков с сугубо нерегулярным расположением вдоль цепи боковых радикалов пространственные структуры с регулярными формами основной цепи, очевидно, не могут во всех случаях обеспечить максимальное число эффективных внутримолекулярных контактов и быть всегда самыми стабильными.

Распространенность представления об энергетической предпочтительности вторичных структур можно объяснить традицией, недооценкой роли боковых цепей и, главным образом, отсутствием альтернативных соображений. В связи с тем, что при статистическом анализе нельзя учесть взаимодействия боковых цепей и определить их конформации, на основе такого подхода невозможно прийти к пониманию принципов пространственной организации белковой молекулы и созданию физической теории. Сложнейшая система взаимодействий боковых цепей специфична для каждого природного аминокислотного порядка, и поэтому только она ответственна за беспредельное многообразие трехмерных структур белковых молекул и их динамических конформационных свойств. Реализующаяся пространственная структура белка определяется конкретной аминокислотной последовательностью. В силу своей уникальности, она непредсказуема на основе статистических характеристик уже изученных белков (речь не идет о гомологах). Понятие "среднего белка" здесь имеет еще меньший смысл, чем, например, понятие "средний автомобиль" или "средний мост".

Предсказание нативной, строго детерминированной структуры белка должно базироваться не на статистическом анализе и эмпирических правилах, а на нелинейной неравновесной термодинамике и физической

теории пространственной организации белковых молекул, принимающих во внимание в каждом случае конкретную аминокислотную последовательность, т.е. на статистико-детерминистической основе (подробно эта проблема будет обсуждена в следующем томе). Чисто вероятностный подход адекватен синтетическим полипептидам, строение и свойства которых статистичны. Белок же в физиологических условиях однозначно детерминирован как в отношении своих конформационных свойств, так и функции.

Рассмотренные исследования объединяет общая стратегия решений структурной задачи проблемы белка. Она заключается в том, чтобы на первом этапе с помощью эмпирических корреляций предсказать участки регулярных структур боковой цепи; затем на этой же основе предсказать супервторичные структуры и, таким образом, получить грубую модель всей молекулы белка, отражающую главные особенности реальной структуры, и, наконец, на последнем этапе уточнить ее путем минимизации энергии при вариации всех степеней свободы. Тем самым исключается рассмотрение на первый взгляд нерешаемой задачи нахождения глобальной структуры белка из огромного числа вероятных конформаций макромолекулы. Выше, однако, было показано, что не только невозможно создать совершенный предсказательный алгоритм, но при наличии последнего все равно нельзя прийти к удовлетворительному начальному приближению. Поэтому при выборе такой стратегии поиска решений структурной проблемы белка цель остается принципиально недостижимой.

Итак, можно сделать вывод, что во всех исследованиях, направленных на разработку эмпирических корреляций между аминокислотной последовательностью и вторичной и супервторичной структурами, не адекватными изучаемому явлению оказываются и заложенное в их основу представление о пространственной организации белка, и используемые методы, и выбранная стратегия поиска решений проблемы. Такой путь следует считать бесперспективным, так как он в принципе, а не в силу большой сложности проблемы или недостатка имеющегося на сегодняшний день экспериментального материала, не может привести к конечной цели — априорному количественному описанию геометрии и конформационных возможностей всех остатков в белковой глобуле. Более того, он не может дать и промежуточных данных о структуре и ее отдельных частях, полезных для последующего уточнения. Ценность выполненных в этом направлении работ состоит в накопленном опыте, указывающим на необходимость поиска иного, неэмпирического, пути решения конформационной задачи проблемы белка.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Pauling L., Corey R.B. // J. Amer. Chem. Soc. 1950. Vol. 72. P. 5349.
2. Pauling L., Corey R.B. // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1951. Vol. 37. P. 205-285.
3. Linderstrom-Long K. // Proteins and enzymes. Stanford. (Calif.) Stanford Univ. press. 1952. P. 93-112. (Lane med. Lect.; Vol. 6).
4. Kausmann W. // Adv. Protein Chem. 1959. Vol. 14. P. 1-63.

5. Lumry R., Eyring H. // J. Phys. Chem. 1954. Vol. 58. P. 110–120.
6. Mirsky A.E., Pauling L. // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1936. Vol. 22. P. 439–447.
7. Anfinsen C.B. // Science. 1973. Vol. 181. P. 223–230.
8. Astbury W.T. // Trans. Faraday Soc. 1933. Vol. 29. P. 193–202.
9. Pauling L. // J. Amer. Chem. Soc. 1940. Vol. 62. P. 2643–2657.
10. Huggins M.L. // Chem. Rev. 1943. Vol. 32. P. 195–220.
11. Huggins M.L. // Annu. Rev. Biochem. 1942. Vol. 11. P. 27–50.
12. Bragg L., Kendrew J.C., Perutz M.F. // Proc. Roy. Soc. London A. 1950. Vol. 203. P. 321–357.
13. Coulson C.A. // Research. 1957. Vol. 10. P. 149–156.
14. Соколов Н.Д. Водородная связь. М.: Наука, 1964.
15. Lippincott E.R., Schroeder R. // J. Chem. Phys. 1955. Vol. 23. P. 1099–1104.
16. Schroeder R., Lippincott E.R. // Ibid. 1957. Vol. 61. P. 921–929.
17. Moulton W.G., Kromhout R.S. // Ibid. 1956. Vol. 25. P. 34–38.
18. Scott R.A., Scheraga H.A. // Ibid. 1966. Vol. 45. P. 2091–2099.
19. Ooi T., Scott R.A., Vanderkooi G. et al. // Ibid. 1967. Vol. 46. P. 4410–4418.
20. De Santis P., Giglio E., Liguori A.M. et al. // Nature. 1965. Vol. 206. P. 456–462.
21. Stockmayer W.H. // J. Chem. Phys. 1941. Vol. 9. P. 398–403.
22. Poland D., Scheraga H.A. // Biochemistry. 1967. Vol. 6. P. 3791–3792.
23. Попов Е.М., Дашевский В.Г., Липкинд Г.М. и др. // Молекуляр. биология. 1968. Т. 2. С. 612–622.
24. Morse P.M. // Phys. Rev. 1929. Vol. 34. P. 57–62.
25. Blout E.R., Lenormant H. // Nature. 1957. Vol. 179. P. 960–963.
26. Doty P., Imahori K., Klemperer E. // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1958. Vol. 44. P. 424–428.
27. Doty P., Gratzer W.B. // Poliamino acids, polypeptides and proteins / Ed. M. Stahmann. Madison: Univ. Wis. press, 1962. P. 111–119.
28. Blout E.R. // Ibid. P. 275–279.
29. Schellman J.A. // C. r. Lab. Carlsberg. Ser. chim. 1955. Vol. 29. P. 223–234.
30. Klotz I.M., Fransen J.S. // J. Amer. Chem. Soc. 1960. Vol. 82. P. 5241–5247.
31. Klotz I.M., Fransen J.S. // Ibid. 1962. Vol. 84. P. 3461–3466.
32. London F. // Ztschr. Phys. Chem. Abt. 1930. Bd. 11. S. 222–231.
33. Slater J.C., Kirkwood J.G. // Phys. Rev. 1931. Vol. 37. P. 682–711.
34. Бреслер С.Е. Введение в молекулярную биологию. М.; Л.: Наука, 1966. 350 с.
35. Frank H.S., Evans M.W. // J. Chem. Phys. 1945. Vol. 13. P. 507–513.
36. Bohon R.L., Claussen W.F. // J. Amer. Chem. Soc. 1951. Vol. 73. P. 1571–1577.
37. Claussen W.F., Polglase M.F. // Ibid. 1952. Vol. 74. P. 4817–4822.
38. Butler J.A.V. // Trans. Faraday Soc. 1937. Vol. 33. P. 235–248.
39. Eley D.D. // Ibid. 1939. Vol. 35. P. 1421–1433.
40. Edsall J.T., Scatchard G. // Proteins, amino acids and peptides as dipolar ions / Ed. E.J. Cohn, J.T. Edsall. N.Y.: Reinhold, 1943. P. 1–53.
41. Goddard E.D., Hoeve C.A.J., Benson G.C. // J. Phys. Chem. 1957. Vol. 61. P. 593–600.
42. Frank H.S., Wen W.-Y. // Discuss. Faraday Soc. 1957. Vol. 24. P. 133–140.
43. Nemethy G., Scheraga H.A. // J. Chem. Phys. 1962. Vol. 36. P. 3382–3389.
44. Nemethy G., Scheraga H.A. // Ibid. P. 3401–3416.
45. Glew D.N. // J. Phys. Chem. 1962. Vol. 66. P. 605–611.
46. Poland D., Scheraga H.A. // Biopolymers. 1965. Vol. 3. P. 275–401.
47. Poland D., Scheraga H.A. // Poly- α -amino acids / Ed. G.D. Fasman. N.Y.: Dekker, 1967. P. 71–130.
48. Nemethy G., Scheraga H.A. // J. Phys. Chem. 1962. Vol. 66. P. 1773–1785.
49. Scheraga H.A. Proteins / Ed. H. Neurath. 2nd ed. N.Y.: Acad. press, 1963. Vol. 1. P. 478–530.
50. Fischer H.F. // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1964. Vol. 51. P. 1285–1290.
51. Tanford C. // J. Amer. Chem. Soc. 1962. Vol. 84. P. 4240–4245.
52. Tanford C. // Adv. Protein Chem. 1962. Vol. 17. P. 69–112.
53. Tanford C. // J. Amer. Chem. Soc. 1964. Vol. 86. P. 2050–2059.
54. Brandts J.F. // Ibid. P. 4291–4301.
55. Brandts J.F. // Ibid. P. 4302–4309.
56. Brandts J.F. // Ibid. Vol. 87. P. 2759–2763.

57. Brandts J.F. Thermobiology / Ed. A.N. Rose. N.Y.: Acad. press, 1967.
58. Brandts J.F., Hunt L. // J. Amer. Chem. Soc. 1967. Vol. 89. P. 4826.
59. Brandts J.F. // Structure and stability of biological macromolecules / Ed. S.N. Timasheff, G. Fasman. N.Y.: Dekker, 1969. P. 213–290.
60. Muller N. // Assoc. Chem. Res. 1990. Vol. 23. P. 23–28.
61. Guzzo A.V. // Biophys. J. 1965. Vol. 5. P. 809–814.
62. Blout E.R., De Loze C., Bloom S.M. et al. // J. Amer. Chem. Soc. 1962. Vol. 84. P. 458.
63. Prothero I.W. // Biophys. J. 1966. Vol. 6. P. 367–373.
64. Havsten B. // J. Theor. Biol. 1966. Vol. 10. P. 1–10.
65. Peritti P.F., Quagliarotti G., Liquori A.M. // J. Mol. Biol. 1967. Vol. 24. P. 313–322.
66. Schiffer M., Edmundson A.B. // Biophys. J. 1967. Vol. 7. P. 121–130.
67. Low B.W., Edsall J.T. // Currents in biochemical research / Ed. D.E. Green. N.Y.: Intersci. Publ. 1956. P. 378–433.
68. Cook D.A. // J. Mol Biol. 1967. Vol. 29. P. 167–173.
69. Low B.W., Lowell F.M., Rudco A.D. // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1968. Vol. 60. P. 1519–1526.
70. Ptitsyn O.B. // J. Mol. Biol. 1969. Vol. 42. P. 501–510.
71. Kotelchuck D., Scheraga H.A. // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1968. Vol. 61. P. 1163–1170.
72. Kotelchuck D., Scheraga H.A. // Ibid. 1969. Vol. 62. P. 14–21.
73. Finkelstein A.V., Ptitsyn O.B. // J. Mol. Biol. 1971. Vol. 62. P. 613–624.
74. Lewis P.N., Scheraga H.A. // Arch. Biochem. and Biophys. 1971. Vol. 144. P. 576–583.
75. Lewis P.N., Scheraga H.A. // Ibid. P. 584–588.
76. Venkatachalam C.M. // Biopolymers. 1968. Vol. 6. P. 1425–1432.
77. Попов Е.М. // Молекуляр. биология. 1970. Т. 4. С. 609–616.
78. Lewis P.N., Motany F.A., Sheraga H.A. // Isr. J. Chem. 1973. Vol. 11. P. 121–180.
79. Птицын О.Б. // Вестн. АН СССР. 1973. Т. 5, № 6. с. 57–68.
80. Есипова Н.Г., Туманян В.Г. // Молекуляр. биология. 1972. Т. 6. С. 840–848.
81. Денисюк А.И., Птицын О.Б., Финкельштейн А.В. // Биофизика. 1974. Т. 19. С. 549–560.
82. Beghin F., Dirx J. // Arch. Intern. Physiol. Biochim. 1975. Vol. 83. P. 167–168.
83. Crawford J.L., Lipscomb W.N., Schellman C.G. // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1973. Vol. 70. P. 538–547.
84. Wu T.T., Kabat E.A. // Ibid. 1971. Vol. 68. P. 1501–1506.
85. Kabat E.A., Wu T.T. // Biopolymers. 1973. Vol. 12. P. 751–774.
86. Kabat E.A., Wu T.T. // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1973. Vol. 70. P. 1473–1477.
87. Kabat E.A., Wu T.T. // Ibid. 1974. Vol. 71. P. 4217–4220.
88. Kabsch W., Sander Ch. // Ibid. 1984. Vol. 81. P. 1075–1078.
89. Robson B., Pain R.H. // J. Mol. Biol. 1971. Vol. 58. P. 237–259.
90. Robson B., Pain R.H. // Biochem. J. 1974. Vol. 141. P. 869–882.
91. Robson B. // Ibid. P. 853–867.
92. Robson B. // Trends Biochem. Sci. 1976. Vol. 3. P. 49–50.
93. Robson B., Suzuki E. // J. Mol. Biol. 1976. Vol. 107. P. 327–356.
94. Nagano K. // Ibid. 1973. Vol. 75. P. 401–420.
95. Лим В.И. // ДАН СССР. 1972. Т. 203. С. 480–484.
96. Лим В.И. // Биофизика. 1974. Т. 19. С. 562–575.
97. Lenstra J.A. // Biochim. et biophys. acta. 1977. Vol. 491. P. 333–338.
98. Chou P.Y., Fasman G.D. // Biochemistry. 1974. Vol. 13. P. 211–221.
99. Chou P.Y., Fasman G.D. // Ibid. P. 222–245.
100. Chou P.Y., Fasman G.D. // J. Mol. Biol. 1977. Vol. 115. P. 135–175.
101. Burgess A.W., Ponnuswamy P.K., Scheraga A.H. // Isr. J. Chem. 1974. Vol. 12. P. 239–286.
102. Schulz G.E., Barry C.D., Friedman J. et al. // Nature. 1974. Vol. 250. P. 140–142.
103. Птицын О.Б., Рашин А.А. // ДАН СССР. 1973. Т. 213. С. 413–416.
104. Ptitsyn O.B., Rashin A.A. // Biophys. Chem. 1975. Vol. 3. P. 1–20.
105. Лим В.И. // ДАН СССР. 1975. Т. 222. С. 1467–1469.
106. Lim V.I., Efimov A.V. // FEBS Lett. 1976. Vol. 69. P. 41–44.
107. Лим В.И., Мазанов А.Л., Ефимов А.В. // Молекуляр. биология. 1978. Т. 12. С. 206–212.

108. Лим В.И. // Там же. С. 213–218.
109. Мазанов А.Т., Лим В.И. // Молекуляр. биология. 1978. Т. 12. С. 219–232.
110. Srinivansan R. // *Ind. J. Biochem. and Biophys.* 1976. Vol. 13. P. 192–193.
111. Finkelstein A.V., Ptitsyn O.B. // *J. Mol. Biol.* 1976. Vol. 103. P. 15–24.
112. Finkelstein A.V., Ptitsyn O.B. // *Biopolymers.* 1977. Vol. 16. P. 469–495.
113. Finkelstein A.V., Kozitsyn S.A., Ptitsyn O.B. // *FEBS Lett.* 1975. Vol. 60. P. 137–140.
114. Finkelstein A.V., Ptitsyn O.B. // *Biopolymers.* 1977. Vol. 16. P. 497–524.
115. Finkelstein A.V. // *Ibid.* P. 525–529.
116. Cummings A.L., Eyring E.M. // *Ibid.* 1975. Vol. 14. P. 2107–2114.
117. Zana R. // *Ibid.* P. 2425–2428.
118. Goodman M., Naider F., Toniolo C. // *Ibid.* 1971. Vol. 10. P. 1719–1730.
119. Goodman M., Verdini A.S., Toniolo C. et al. // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1969. Vol. 64. P. 494–500.
120. Epand R.M., Scheraga H.A. // *Biochemistry.* 1968. Vol. 7. P. 2864–2872.
121. Singhall R.P., Atassi M.Z. // *Ibid.* 1970. Vol. 9. P. 4252–4259.
122. Hurrell J.D.R., Smith J.A., Leach S.J. // *Ibid.* 1977. Vol. 16. P. 175–185.
123. Astbury W.T., Dickinson S. // *Nature.* 1935. Vol. 135. P. 75.
124. Astbury W.T., Dickinson S. // *Ibid.* P. 765.
125. Richards F.M. // *Annu. Rev. Biochem.* 1963. Vol. 32. P. 278–285.
126. Schwert G.M., Kaufman S. // *J. Biol. Chem.* 1951. Vol. 190. P. 807–811.
127. Sophianopoulos A.J., Rhodes C.K., Holomb D.N. // *Ibid.* 1962. Vol. 237. P. 1107–1110.
128. Rothen A.J. // *Gen. Physiol.* 1940–1941. Vol. 24. P. 203–207.
129. Heins J.N., Suriano J.R., Taniuchi H. et al. // *J. Biol. Chem.* 1967. Vol. 242. P. 1016–1021.
130. Kauzmann W., Moore K., Schultz G. // *Nature.* 1974. Vol. 248. P. 447–449.
131. Gabel D., Rasse D., Scheraga H.A. // *Intern. J. Peptide and Protein Res.* 1976. Vol. 8. P. 237–252.
132. Tsernoglou D., Petsko G.A. // *FEBS Lett.* 1976. Vol. 68. P. 1–4.
133. Low B.W., Preston H.S., Sato A. et al. // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1976. Vol. 73. P. 2991–2994.
134. Maxfield F.R., Scheraga H.A. // *Biochemistry.* 1976. Vol. 15. P. 5138–5153.
135. Garnier J., Osguthorpe D.J., Robson B. // *J. Mol. Biol.* 1978. Vol. 120. P. 97–120.
136. Nagano K. // *J. Mol. Biol.* 1977. Vol. 109. P. 235–250.
137. Nagano K. // *Ibid.* P. 251–274.
138. Nemethy G., Scheraga H.A. // *Quart. Rev. Biophys.* 1977. Vol. 10. P. 239–352.
139. Burgess A.W., Scheraga H.A. // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1975. Vol. 72. P. 1221–1225.
140. Sternberg M.J.F., Thornton J.M. // *J. Mol. Biol.* 1976. Vol. 105. P. 367–382.
141. Sternberg M.J.F., Thornton J.M. // *Ibid.* 1977. Vol. 110. P. 269–283.
142. Sternberg M.J.F., Thornton J.M. // *Ibid.* P. 285–296.
143. Sternberg M.J.F., Thornton J.M. // *Ibid.* 1977. Vol. 113. P. 401–413.
144. Sternberg M.J.F., Thornton J.M. // *Ibid.* Vol. 115. P. 1–17.
145. Sternberg M.J.F., Thornton J.M. // *Nature.* 1978. Vol. 271. P. 15–20.
146. Lewitt M., Greer J. // *J. Mol. Biol.* 1977. Vol. 114. P. 181–239.
147. Hynes G., Blomberg C. // *Ibid.* Vol. 117. P. 821–824.
148. Crippen G.M. // *Macromolecules.* 1977. Vol. 10. P. 21–25.
149. Crippen G.M. // *Ibid.* P. 25–28.
150. Rose G.D., Seltzer J.P. // *J. Mol. Biol.* 1977. Vol. 113. P. 153–164.
151. Argos P., Schwarz J., Schweiz J. // *Biochem. et biophys. acta.* 1976. Vol. 439. P. 261–273.
152. Lewitt M., Warshell A. // *Nature.* 1975. Vol. 253. P. 694–698.
153. Lewitt M. // *J. Mol. Biol.* 1976. Vol. 104. P. 59–107.
154. Warshell A., Lewitt M. // *Ibid.* Vol. 106. P. 421–437.
155. Kuntz I.D., Crippen G.M., Kollman P.A. et al. // *Ibid.* P. 983–994.
156. Tanaka S., Scheraga H.A. // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1975. Vol. 72. P. 3802–3806.
157. Шульц Г., Ширмер П. Принципы структурной организации белков. М.: Мир, 1982.
158. Matthews B.W. // *Biochem. et biophys. acta.* 1975. Vol. 405. P. 442–450.
159. Kuntz I.D. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1972. Vol. 94. P. 4009–4012; P. 8568–8572.
160. Kuntz I.D. // *Ibid.* P. 8568–8572.
161. Lifson S., Sander C. // *J. Mol. Biol.* 1980. Vol. 139. P. 627–641.

162. Kabsch W., Sander Ch. // FEBS Lett. 1983. Vol. 155. P. 179-182.
163. Robson B., Hillier I.H., Guest M.F. // Chem. Soc. Faraday Trans. Part II. 1978. Vol. 74. P. 1311-1317.
164. Busetta B., Hospital M. // Biochim. et biophys. acta. 1982. Vol. 701. P. 111-118.
165. Nishikawa K. // Ibid. 1983. Vol. 748. P. 285-299.
166. Richardson J., Richardson D. // Science. 1988. Vol. 240. P. 1648-1652.
167. Richardson J., Richardson D. // Prediction of protein structure and the principles of protein conformation / Ed. G.D. Fasman. N.Y.: Plenum press, 1989. P. 1-98.
168. Nakashima H., Nishikawa K., Ooi T. // J. Biochem. (Tokyo). 1986. Vol. 99. P. 153-162.
169. Doolittle R.F. Prediction of protein structure and the principles of protein conformation / Ed. G.D. Fasman. N.Y.: Plenum press, 1989. P. 599-623.
170. Kabsch W., Sander C. // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1984. Vol. 81. P. 1075-1078.
171. Kabsch W., Sander C. // Nature. 1985. Vol. 317. P. 207.
172. Varghese J.N., Laver W.G., Colman P.M. // Ibid. 1983. Vol. 303. P. 35-40.
173. Bloomer A.C., Champness J.N., Bricogne G. et al. // Ibid. 1978. Vol. 276. P. 362-368.
174. Kolb E., Hudson P.J., Harris J.I. // Europ. J. Biochem. 1980. Vol. 108. P. 587-597.
175. Titani K., Hermodson M.A., Ericsson C.H. et al. // Nature. 1982. Vol. 238. P. 35-37.
176. Holmes M.A., Matthews B.W. // J. Mol. Biol. 1982. Vol. 160. P. 623-639.
177. Wilson I.A., Haft D.H., Getzoff E.D. et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1985. Vol. 82. P. 5255-5259.
178. Harrison S.C. // Nature. 1985. Vol. 313. P. 736-737.
179. Leszczynski J.F., Rose G.D. // Science. 1986. Vol. 234. P. 849-855.
180. King C.S., Kneller D.G., Langridge R., Cohen F.E. // J. Mol. Biol. 1992. Vol. 224. P. 685-699.
181. Leszczynski J.F., Rose G.D. // Science. 1986. Vol. 234. P. 47-53.
182. Milner-White E.J., Piet R. // TIBS. 1987. Vol. 12. P. 189-191.
183. Garnier J., Osguthorpe D.J., Robson B. // J. Mol. Biol. 1978. Vol. 120. P. 97-120.
184. Gibrat J.F. Modelization by computers of the 3-D structure of proteins: Ph. D. thesis. P., 1986.
185. Garnier J., Robson B. Prediction of protein structure and the principles of protein conformation / Ed. G.D. Fasman. N.Y.: Plenum press, 1989. P. 417-465.
186. Presell S.R., Cohen B.I., Cohen F.E. // Biochemistry. 1992. Vol. 31. P. 983-993.
187. Qian N., Sejnowski T.J. // J. Mol. Biol. 1988. Vol. 202. P. 865-884.
188. Kneller D.G., Cohen F.E., Langridge R. // Ibid. 1990. Vol. 214. P. 171-182.
189. Scheraga H.A. // Pure and Appl. Chem. 1973. Vol. 36. P. 1-20.
190. Ponnuswamy P.K., Warne P.K., Scheraga H.A. // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1975. Vol. 72. P. 1221-1225.
191. Ptitzyn O.B. // FEBS Lett. 1981. Vol. 131. P. 197-202.
192. Птицын О.Б. // Молекуляр. биология. 1984. Т. 18. С. 574-590.
193. Ptitzyn O.B., Volkenshtein M.V. // J. Biomol. Struct. and Dynamics. 1986. Vol. 4. P. 137-156.
194. Doolittle R.F. Prediction of protein structure and principles of protein conformation / Ed. G.D. Fasman. N.Y.: Plenum press, 1989. P. 599-623.
195. Hagler A.T., Honig B. // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1978. Vol. 75. P. 554-558.
196. Cohen F.E., Sternberg M.J.E. // J. Mol. Biol. 1980. Vol. 138. P. 321-333.
197. Rossmann M.G., Liljas A. // Ibid. 1974. Vol. 85. P. 177-181.
198. Tsernoglou D., Petsko A. // FEBS Lett. 1976. Vol. 68. P. 1-4.
199. Tsernoglou D., Petsko A. // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1977. Vol. 74. P. 971-974.
200. Low B.W., Preston H.S., Sato A. et al. // Ibid. 1976. Vol. 73. P. 2991-2994.
201. Miyazawa S., Jernigan R.L. // Biopolymers. 1982. Vol. 21. P. 1333-1363.
202. Галактионов С.Г., Родионов М.А. // Изв. АН БССР. Сер. биол. наук. 1977. № 5. С. 78-80.
203. Галактионов С.Г., Родионов М.А. // Биофизика. 1980. Т. 25. С. 385-392.
204. Родионов М.А., Галактионов С.Г., Ахрем А.А. // Конформации и функции биологических молекул. Рига: Зинатне, 1984. С. 91-103.
205. Go N., Taketomi H. // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1978. Vol. 78. P. 559-563.
206. Go N., Abe H. // Biopolymers. 1981. Vol. 20. P. 991-1011.
207. Go N. // Intern. J. Peptide and Protein Res. 1975. Vol. 7. P. 313-323.

208. Kanehisa M.J., Tsong T.Y. // J. Mol. Biol. 1978. Vol. 124. P. 177–194.
209. Go N. // Adv. Biophys. 1976. Vol. 9. P. 65–113.
210. Go N. // Annu. Rev. Biophys. and Bioeng. 1983. Vol. 12. P. 183–210.
211. Karplus M., Weaver D.L. // Biopolymers. 1979. Vol. 18. P. 1421–1437.
212. Kim P.S., Baldwin R.L. // Annu. Rev. Biochem. 1979. Vol. 48. P. 459–489.
213. Baldwin R.L. // Protein folding. Amsterdam: Elsevier, 1980. P. 369–384.
214. Brandts J.F. // J. Amer. Chem. Soc. 1964. Vol. 86. P. 4291–4301.
215. Crick F.H.C. // Nature. 1952. Vol. 170. P. 882–883.
216. Pauling L., Corey P.B. // Ibid. 1953. Vol. 171. P. 59–61.
217. Rao S.T., Rossmann M.G. // J. Mol. Biol. 1973. Vol. 76. P. 241–256.
218. Levitt M., Chothia C. // Nature. 1976. Vol. 261. P. 552–558.
219. Phillips D.C. // Sci. Amer. 1966. Vol. 11. P. 78–90.
220. Cunningham B.A., Gottlieb P.D., Pflumm M.N. et al. // Progress in immunology. N.Y.: Acad. press, 1971. P. 3–24.
221. Birktoft J.J., Blow D.M. // J. Mol. Biol. 1972. Vol. 68. P. 187–240.
222. Drenth J., Jansonius J.N., Kockoek R. et al. // Adv. Protein Chem. 1971. Vol. 25. P. 79–115.
223. Drenth J., Hol W.G.J., Jansonius J.N. et al. // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1971. Vol. 36. P. 107–116.
224. Drenth J., Jansonius J.N., Kockoek R. et al. The enzymes-VIII / Ed. P.D. Boyer. 3rd ed. N.Y. etc.: Acad. press, 1971. P. 484–499.
225. Anfinsen C.B. // Biochem. J. 1972. Vol. 128. P. 737–750.
226. Adams M.J., Ford G.C., Kockoek R. et al. // Nature. 1970. Vol. 227. P. 1098–1103.
227. Wendell P.L., Bryant T.N., Watson H.C. // Nature. New Biol. 1972. Vol. 240. P. 134–136.
228. Blake C.C.F., Evans P.R., Scales R.K. // Ibid. Vol. 235. P. 195–198.
229. Steitz T.A., Fletterick R.T., Hwang K.J. // J. Mol. Biol. 1973. Vol. 73. P. 551–561.
230. Wetlaufer D.B. // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1973. Vol. 70. P. 697–701.
231. Doolittle R.F. // Proteins / Ed. H. Neirath, R.L. Hill. N.Y.: Acad. press, 1979. Vol. 4. P. 118.
232. Purvis I.J., Bettany A.J.E., Chinnappan S.T. et al. // J. Mol. Biol. 1987. Vol. 193. P. 413–417.
233. Coggins J.R., Boocock M.R., Campbell M.S. et al. // Biochem. Soc. Trans. 1985. Vol. 13. P. 299–303.
234. Coggins J.R., Boocock M.R. // Multidomain proteins / Ed. D.C. Hardie, J.R. Coggins. Amsterdam: Elsevier, 1986. P. 259–279.
235. Назрадова Н.К., Муронец В.И. Мультидоменная организация ферментов. М.: ВИНТИ, 1991. 162 с. (Итоги науки и техники. Биол. химия; Т. 38).
236. Phillips D.C. // British biochemistry, past and present. L.: Acad. press, 1970. P. 11–28.
237. Kuntz I.D. // J. Amer. Chem. Soc. 1975. Vol. 97. P. 4362–4366.
238. Fasman G.D. Prediction of protein structure and the principles of protein conformation / Ed. G.D. Fasman. N.Y.: Plenum press, 1989. P. 193–316.
239. Wedak S.J., Janin J. // Biochemistry. 1981. Vol. 20. P. 6544–6552.
240. Rashin A. // Nature. 1981. Vol. 291. P. 85–87.
241. Brick P., Bhat D.M., Blow D.M. // J. Mol. Biol. 1988. Vol. 208. P. 83–98.
242. Leszczynski J.F., Rose G.D. // Science. 1986. Vol. 234. P. 47–53.
243. Wallace C.J.A. // J. Biol. Chem. 1987. Vol. 262. P. 16767–16770.
244. Fetrow J.S., Zehfus M.H., Rose G.D. // Biotechnology. 1988. Vol. 6. P. 167–171.
245. Chou P.Y. Prediction of protein structure and the principles of protein conformation / Ed. G.D. Fasman. N.Y.: Plenum press, 1989. P. 549–586.
246. Deleage G., Roux B. // Ibid. P. 587–598.
247. Chou K.C. // J. Mol. Biol. 1992. Vol. 223. P. 509–517.
248. Chou K.C., Znaug C.T. // Europ. J. Biochem. 1992. Vol. 207. P. 429–433.
249. Carlucci L., Chou K.C., Maggiora G.M. // Biochemistry. 1991. Vol. 30. P. 4389–4398.
250. Klein P., Delisi C. // Biopolymers. 1986. Vol. 25. P. 1659–1672.
251. Rossmann M.G., Argos P. // J. Mol. Biol. 1976. Vol. 105. P. 75–96.
252. Richardson J.S. // Nature. 1977. Vol. 268. P. 495–500.
253. Richardson J.S. // Adv. Protein. Chem. 1981. Vol. 34. P. 167–339.
254. Levitt M. // J. Mol. Biol. 1976. Vol. 104. P. 59–107.

255. Chothia C. // *Annu. Rev. Biochem.* 1984. Vol. 53. P. 537–572.
256. Chothia C., Janin J. // *Biochemistry.* 1982. Vol. 21. P. 3955–3965.
257. Chothia C., Lesk A.M. // *J. Mol. Biol.* 1982. Vol. 160. P. 303–342.
258. Levitt M., Greer J. // *Ibid.* 1977. Vol. 114. P. 181–293.
259. levitt M. // *Ibid.* 1983. Vol. 170. P. 723–764.
260. Levitt M. // *Biochemistry.* 1978. Vol. 17. P. 4277–4285.
261. Cohen F.E., Sternberg M.J.E., Taylor W.R. // *Nature.* 1980. Vol. 285. P. 378–382.
262. Cohen F.E., Sternberg M.J.E., Taylor W.R. // *J. Mol. Biol.* 1981. Vol. 148. P. 253–272.
263. Cohen F.E., Sternberg M.J.E., Taylor W.R. // *Ibid.* 1982. Vol. 156. P. 821–862.
264. Cohen C., Parry D.A.D. // *Trends Biochem. Sci.* 1986. Vol. 11. P. 245–248.
265. Fasman G.D. // *Biopolymers.* 1987. Vol. 26. P. 559–579.
266. Richmond R.J., Richards F.M. // *J. Mol. Biol.* 1978. Vol. 119. P. 537–555.
267. Cohen F.E., Sternberg M.J.E. // *Ibid.* Vol. 137. P. 9–22.
268. Cohen F.E., Richmond J.T., Richards F.M. // *Ibid.* 1979. Vol. 132. P. 275–288.
269. Sternberg M.J.E., Cohen F.E., Taylor W.R. et al. // *Philos. Trans. Roy. Soc. London B.* 1981. Vol. 293. P. 177–189.
270. Robson B., Osguthorpe D.J. // *J. Mol. Biol.* 1979. Vol. 132. P. 19–51.
271. Cohen F.E., Richmond J.T., Richards F.M. // *Ibid.* P. 275–288.
272. Cohen F.E., Abarbanel R.M., Kuntz I.D. et al. // *Biochemistry.* 1983. Vol. 22. P. 4894–4904.
273. Cohen F.E., Sternberg M.J.E. // *J. Mol. Biol.* 1980. Vol. 137. P. 9–22.
274. Edwards M.S., Sternberg M.J.E., Thornton J.M. // *Protein Eng.* 1987. Vol. 1. P. 173–181.
275. Hurle M.R., Matthews C.R., Cohen F.E. et al. // *Proteins.* 1987. Vol. 2. P. 210–224.
276. Cohen F.E., Kosen P.A., Kuntz I.D. et al. // *Science.* 1986. Vol. 234. P. 349–356.
277. Brandhuber B.J., Boone T., Kenney W.C. et al. // *Ibid.* 1987. Vol. 283. P. 1707–1709.
278. Cohen F.E., Kuntz I.D. // *Proteins.* 1987. Vol. 1. P. 162–166.
279. Sachs D.H., Schechter A.N., Eastlake A. et al. // *J. Immunol.* 1972. Vol. 109. P. 1300–1310.
280. Cohen F.E., Abarbanel R.M., Kuntz I.D. et al. // *Biochemistry.* 1986. Vol. 25. P. 266–275.
281. Havel T.F., Kuntz I.D., Crippen G.M. // *Bull. Math. Biol.* 1983. Vol. 45. P. 665–720.
282. Richards F.M. // *Annu. Rev. Biophys. and Bioeng.* 1977. Vol. 6. P. 151–176.
283. Shoemaker K.R., Kim P.S., York E.I. et al. // *Nature.* 1987. Vol. 326. P. 563–567.
284. Abdel-Meguid S.S., Shieh H.S., Smith W.W. et al. // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1987. Vol. 84. P. 6434–6437.
285. Carlucci L., Chou K.-C., Maggiora G.M. // *Biochemistry.* 1991. Vol. 30. P. 4389–4398.
286. Chou K.C., Maggiora G.M., Nemethy G., Scheraga H.A. // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1988. Vol. 85. P. 4295–4299.
287. Vasquez M., Nemethy G., Scheraga H.A. // *Macromolecules.* 1983. Vol. 16. P. 1043–1049.
288. Chou K.C., Nemethy G., Rumsey S. et al. // *J. Mol. Biol.* 1986. Vol. 188. P. 641–649.
289. Carlucci L., Chou K.C. // *J. Comput. Chem.* 1991. Vol. 12. P. 410–415.

Часть III

СВЕРТЫВАНИЕ БЕЛКОВОЙ ЦЕПИ В НАТИВНУЮ КОНФОРМАЦИЮ

Глава II

КОНФОРМАЦИОННЫЕ СОСТОЯНИЯ БЕЛКОВОЙ ЦЕПИ

Для познания принципов структурной организации белковых молекул огромный интерес представляет явление денатурации. Переход нативной конформации белка в развернутую неструктурированную форму и обратный переход флуктуирующей полипептидной цепи в исходную компактную трехмерную структуру есть не что иное, как непосредственный процесс разрушения и формирования именно тех самых взаимодействий, которые и обуславливают структурную организацию белковой молекулы. Иными словами, при свертывании и разворачивании полипептидной цепи проявляется прямая связь между химическим и пространственным строением белка. Изучение денатурации позволило сформулировать фундаментальное положение о том, что нативная конформация белковой молекулы отвечает термодинамически равновесному состоянию. Ее свободная энергия является функцией состояния и как таковая не зависит от конкретного пути свертывания белковой цепи (*in vivo* или *in vitro*), т.е. от предыстории, а определяется только составом и порядком расположения аминокислот в последовательности. Трансляция линейной информации в трехмерную структуру возможна, однако только при определенных физиологических условиях (температура, давление, pH, ионная сила, наличие простетических групп, ионов металлов и т.д.). При соблюдении этих условий процесс свертывания полипептидной цепи осуществляется спонтанно: принятие белком нативной конформации не требует какого-либо морфогенетического молекулярного аппарата. Самопроизвольный характер процесса, подчиняющегося второму началу термодинамики, свидетельствует о том, что сборка компактной структуры белка сопровождается понижением свободной энергии Гиббса системы, включающей свертываемую полипептидную цепь и среду.

Р. Ламри и Г. Эйринг постулировали, что нативная конформация белка отвечает абсолютному минимуму энергии, т.е. является глобальной [1]. Этому постулату, известному больше под названием термодинамической гипотезы К. Анфинсена, не противоречат результаты всех

последующих работ по изучению денатурации белков [2]. Однако, строго говоря, не исключается и альтернативное положение, высказанное С. Левинталем [3]. Оно заключается в том, что структура нативного белка не обязательно должна обладать самой низкой энергией Гиббса, чтобы быть стабильной и свертываться спонтанно. В силу своей сложности молекула белка может находиться в метастабильном состоянии, т.е. отвечать не глобальному, а одному из локальных минимумов энергии. Еще задолго до этого, в 1935 г., Э. Бауэр — автор первого труда по теоретической биологии, видел в особом деформированном состоянии молекул специфику структурной организации белков, определяющую их биологические свойства [4]. Представление о метастабильном состоянии белковых молекул и о достаточной устойчивости этого состояния привело к формулировке так называемой кинетической гипотезы свертывания белка (Д. Уетлауфер и С. Ристоу [5]). В настоящее время не существует экспериментального метода, с помощью которого можно было бы различить стабильное и нестабильное состояние белковой молекулы. Конечно, при образовании такой сложной структуры априори нельзя исключить ситуацию, при которой глобальный минимум энергии окажется окруженным высоким потенциальным барьером и поэтому явится кинетически недостижимым. В данной главе и далее обсуждаются главным образом экспериментальные исследования процессов свертывания и разворачивания белков, причем наибольшее внимание сосредоточено на молекулярных аспектах денатурации.

Перед рассмотрением вопроса о том, как осуществляется свертывание белковой цепи в нативную трехмерную структуру, необходимо дать хотя бы краткую характеристику двум предельным в термодинамическом смысле конформационным состояниям белковой молекулы, отвечающим развернутой и свернутой в компактную глобулу полипептидной цепи. Представленный ниже материал следует рассматривать как введение к теме структурной организации белков.

11.1. НАТИВНОЕ И ДЕНАТУРИРОВАННОЕ СОСТОЯНИЯ

Белок — понятие, определяющее особое термодинамическое состояние эволюционно отобранной аминокислотной последовательности. Эта последовательность становится физиологически активной молекулой (т.е. тем, что называется белком) и может неограниченно долго пребывать в таком состоянии только при достижении своей нативной пространственной структуры, что возможно лишь при определенных внешних условиях. В морфологическом отношении структура белка характеризуется плотнейшей упаковкой, существованием вторичных и всякого рода иных сегментов, многочисленных поворотов цепи, рядом других структурных особенностей, а также наличием во многих случаях дисульфидных связей. Денатурация нативной конформации белка — это переход аминокислотной последовательности в иное термодинамическое состояние, характеризующееся неструктурированной флуктуирующей полипептидной цепью, лишенной дисульфидных связей. Дена-

турация может быть вызвана повышением или понижением температуры, соответствующими изменениями рН, состава и концентрации солей, добавлением в раствор органических соединений (гуанидингидрохлорида, мочевины и др.), высоким давлением и расщеплением дисульфидных связей. При этом, как принято говорить, полипептидная цепь переходит из свернутого состояния в развернутое. Следует, однако, заметить, что термин "развернутая цепь" не определяет однозначным образом термодинамическое состояние аминокислотной последовательности, поскольку денатурация является многоступенчатым процессом. Термин не в полной мере соответствует также тому геометрическому образу, который может ассоциироваться с его названием. В данном случае слова "развернутая" или даже "полностью развернутая цепь" не означают близкую к линейной вытянутую последовательность.

Вначале будет рассмотрена только полностью развернутая полипептидная цепь, что отвечает термодинамическому состоянию аминокислотной последовательности на последней ступени денатурации, когда она уже лишена всех структурных элементов нативной конформации белка и дисульфидных связей. Такое состояние термодинамически равновесно, стабильно в постоянных условиях и называется статистическим клубком. Клубок качественно отличается от другого предельного состояния — нативной трехмерной структуры белка, поскольку это уже не детерминантная пространственная форма, а огромное множество близких по энергии, непрерывно флуктуирующих и преимущественно свернутых, но тем не менее рыхлых конформаций. Если физические и химические свойства аминокислотной последовательности в физиологических условиях строго детерминированы пространственной структурой белка, то свойства той же последовательности, полностью денатурированной, обусловлены статистической природой клубка. По отношению к этому состоянию теряют смысл такие понятия, как геометрия трехмерной структуры, функциональная специфичность, взаимообусловленность, кооперативность состояний различных частей цепи и т.д., одним словом, те понятия, которые отражают уникальность свойств аминокислотной последовательности каждой белковой макромолекулы в естественном, физиологически активном состоянии. Детерминация нативной трехмерной структуры белка, однако, не означает ее статичность и полное отсутствие флуктуаций.

Детальное представление о нативных конформациях белков основано почти исключительно на результатах рентгеноструктурного анализа. Спектральные методы конформационного исследования белков в растворе пока не имеют в определении геометрии макромолекул самостоятельного значения. Однако они могут быть полезными в изучении ряда свойств белков и обнаружении связанных с ними новых явлений. Так, некоторые спектральные методы чувствительны к конформационным состояниям, внешнему окружению и изменениям положений атомных групп в структуре белковой макромолекулы и даже к небольшим перемещениям отдельных атомов. Интерпретация подобных фактов тем не менее осуществляется в основном с помощью рентгеноструктурных моделей.

Долгое время существовало опасение, что пространственное строение белков в условиях кристаллической решетки отличается от строения в растворе. Однако, как утверждали Крик, Кендрию и Перутц еще до расшифровки первых рентгенограмм белков и получения бесспорных доказательств, это опасение лишено серьезных оснований. Сейчас очевидно (Дж. Рапли [6], Б. Мэтьюз [7]), что различия в конформациях белков в кристалле и растворе могут явиться скорее редким исключением [6—9], чем правилом, и коснуться положений некоторых боковых цепей на периферии глобулы. Устойчивость нативной конформации белка неудивительна, если учесть, что для кристаллов белков характерна высокая степень гидратации (приблизительно половина их объема занята водой), а также слабость и немногочисленность (в расчете на одну молекулу) межмолекулярных контактов в кристаллической решетке. Поэтому белок в кристалле находится примерно в том же состоянии, что и в растворе, и, как правило, сохраняет свою физиологическую активность.

Термодинамическое состояние аминокислотной последовательности определяется взаимодействиями атомов основной и боковой цепей в пределах каждого остатка и взаимодействиями остатков между собой и с молекулами окружения, прежде всего молекулами воды. Рассмотрим некоторые характерные для нативного состояния белковой молекулы особенности этих взаимодействий. Они были выяснены путем непосредственного наблюдения и соответствующей математической обработки моделей известных кристаллографических структур белков. Проведенный анализ позволил получить представление о характере распределения различных остатков на поверхности глобулы и в ее внутренней части, а также о плотности упаковки атомов и их доступности молекулам растворителя.

Б. Ли и Ф. Рихардс [10] впервые в 1971 г., а позднее А. Шрейк и Дж. Рапли [11], введя определенные геометрические критерии, учитывающие контактные радиусы, число возможных межатомных взаимодействий и размеры молекул растворителя, рассчитали степень экспонированности атомов на поверхности белковой глобулы и таким образом определили статистическую доступность аминокислотных остатков молекулам растворителя. Оценки, сделанные для небольших белков (миоглобина, лизоцима и рибонуклеазы S), показали, что средняя доступность атомов независимо от их полярности в нативной конформации приблизительно в три раза меньше, чем у гипотетической полностью растянутой аминокислотной последовательности. С. Чотиа, используя тот же метод на большом числе объектов, нашел линейную зависимость между уменьшением доступной растворителю площади при свертывании аминокислотной последовательности и молекулярной массой белка [12].

Наибольший интерес при анализе кристаллографических моделей, естественно, представлял вопрос о характере распределения в белковой глобуле полярных и неполярных остатков. Полученные здесь результаты оказались неожиданными, поскольку они далеко не в полной мере согласовывались с представлением о доминантной роли гидро-

фобных взаимодействий, как, впрочем, и водородных связей, в пространственной организации белка. Результаты противоречили той общепринятой трактовке гидрофобных взаимодействий, согласно которой белковая глобула состоит из гидрофобного ядра и полярной оболочки. Гидрофобная модель согласуется с идеями Ленгмюра и Козмана. В частности, она базируется на спорном предположении о возможности строгого деления стандартных аминокислот на полярные (гидрофильные) и неполярные (гидрофобные). Это крайне затрудняет, если не исключает, трансформацию феноменологической концепции Козмана, в принципе правильно трактующей природу гидрофобных взаимодействий, в количественную теорию структурной организации нативной конформации белка. Четкой границы между аминокислотными остатками нельзя провести, по крайней мере, по трем причинам. Во-первых, имеется представительная промежуточная группа аминокислот; во-вторых, у большинства полярных остатков, несущих даже целочисленные заряды, значительную часть боковых цепей составляют неполярные атомные группы и, в-третьих, пептидные связи основной цепи, безусловно являющиеся полярными, даже если они образуют между собой водородные связи, принадлежат всем остаткам. Не спасает, а еще более запутывает предположение об отнесении к полярным и неполярным группировкам не целых аминокислотных остатков, а их отдельных частей (в этом случае каждый остаток делится на две, а чаще всего на три атомные группы). Пространственно отделить многочисленные полярные группы от неполярных и образовать из первых гидрофильную оболочку глобулы, а из вторых — гидрофобное ядро не представляется возможным (при данной валентной схеме) в силу несопоставимости частей и целого.

Анализы кристаллографических моделей белков, проведенные И. Клотцем [13], Б. Ли и Ф. Рихардсом [10], не выявили тенденции так называемых полярных остатков находиться на поверхности, а неполярных — во внутренней части глобулы. Расчеты показали, что половина поверхности, экспонированной к растворителю, состоит из углеводородных атомных групп так называемых полярных остатков и боковых цепей неполярных остатков, в то время как многие полярные группы экранированы от растворителя и находятся не на периферии, а в интерьере пространственной структуры белка. И. Кунтц, рассматривая модель карбоксипептидазы, пришел к выводу о преимущественном расположении внутренних неполярных боковых цепей в промежуточных между α -спиралями и β -структурами областях [14]. По предположению Кунтца, назначение таких неполярных контактов заключается в стабилизации третичной структуры белка посредством дисперсионных взаимодействий между вторичными структурами.

Такое же заключение сделал Чотиа из анализа расположения полярных и неполярных остатков в α -спиралях, β -структурах в экспонированной к растворителю поверхности шести белков [12]. Однако Танака и Шерага показали, что контактные области вторичных структур содержат как полярные, так и неполярные аминокислотные остатки [15, 16]. В 1978 г. Д. Уертц и Г. Шерага проанализировали распре-

деление различных остатков во внутренних областях и на поверхности глобул 20 белков в зависимости от их конформационного состояния (α -спирального, β -структурного и нерегулярного) [17]. Четких закономерностей в распределении полярных и неполярных остатков найдено не было; отмечено лишь, что β -структуры находятся преимущественно внутри глобулы, а нерегулярные свернутые формы — на ее поверхности, что, очевидно, по-другому быть не может. Тем не менее и сегодня господствующим остается традиционное представление в духе концепции У. Козмана. В 1990 г. Т. Крейтон, обсуждая пространственное строение молекул гомологичных белков, писал: "Большинство поразительно сходных аспектов гомологичных структур сводится к сохранению неполярного характера боковых цепей во внутренней части глобулы плюс преобладание гидрофильных боковых цепей на поверхности. ...гидрофобное ядро, по-видимому, является главным стабилизирующим фактором "нормального свернутого состояния" [18. С. 5].

В связи с возможностью анализировать рентгеноструктурные модели большого количества белков с точки зрения распределения в глобуле различных аминокислотных остатков открылась перспектива для проверки гидрофобной концепции структурной организации белковой макромолекулы, понимания роли разных факторов в стабилизации трехмерной структуры, и для получения эмпирических, возможно даже, количественных соотношений между этими факторами и распределением остатков различной природы в тех или иных частях белковой глобулы. Возникла надежда объединить α -спиральную концепцию и разработанные на ее основе методы предсказания вторичных структур с гидрофобной концепцией и результатами анализа кристаллографических моделей и установить непрерывную логическую связь между первичной, вторичной и третичной структурами, т.е. создать теорию пространственной организации белка.

В середине 1970-х годов ситуация с решением структурной проблемы белка многими представлялась если не совсем простой, то, во всяком случае, достаточно определенной в отношении направленности поиска. Почти никто не сомневался в том, что нативная конформация белка — ансамбль вторичных, регулярных структур, для которых были разработаны многочисленные методы, "... позволяющие в удовлетворительном согласии с экспериментом локализовать спиральные участки в глобулярных белках" [19. С. 375]. Переход от вторичной к третичной структуре не представлялся сложным, поскольку господствующим и по существу единственным было мнение о том, что "...обширный экспериментальный материал по пространственным структурам и внутри-молекулярным упаковкам глобулярных белков приводит к выводу, что наиболее яркими впечатляющими структурными особенностями глобулярных белков являются: 1) компактность формы; 2) наличие плотно-упакованного ядра (ядер) и полярной оболочки. Именно эти структурные принципы организации выделяют глобулярные белки в отдельный класс биополимеров и должны быть основополагающими при анализе конформации полипептидной цепи глобулярного белка, включая ее

вторичную структуру" [19. С. 376]. Реальные конформации белковых молекул, однако, не соответствовали подобным представлениям, и все надежды решить проблему структурной организации белков на такой основе оказались тщетными. Приблизительно в это же время (вторая половина 1970-х годов) обнаруживаются факты, не отвечающие концепции вторичных структур и прямо не соответствующие концепции гидрофобных взаимодействий.

Рассматривая причины конформационной устойчивости белков, Р. Ламри и Р. Билтонен делают такое заключение: "Действительно, похоже, что нет предела изобретательности исследователей, предлагающих новые и новые существенные факторы. Легко перечислить различные предположения, но гораздо труднее классифицировать действующие силы в терминах количественных вкладов в энтальпию и энтропию образования конформации цепи для любого белка. Трудность состоит в том, что ни один из факторов не оказывает преобладающего влияния на термодинамическую ситуацию" [20. С. 42]. Высказывание относится к 1969 г., но выраженная в нем мысль правильно отражает положение, сложившееся в этой области спустя десятилетие.

Что же касается попыток установить зависимость между первичной и вторичными структурами белков, то Ламри и Билтонен отмечают: "Недавно появилась новая игра, в которой рентгенографические структуры белков объясняются расположением вдоль пептидных цепей полярных незаряженных групп, полярных заряженных групп и неполярных групп различных размеров. Хотя, по-видимому, опасно относиться к этому слишком серьезно, игра может принести существенную пользу как средство для классификации по значимости факторов термодинамической стабильности" [20. С. 64]. Как показано в предшествующей части книги, даже эта скромная надежда осталась нереализованной. Ситуация в изучении структурной организации белков в 1960—1980-е годы в чем-то аналогична 20—40-м годам нашего столетия — периоду в исследовании химического строения белков, который последовал сразу после Фишера и продолжался до фундаментальных работ Э. Вальдшмидт-Лейтца и Ф. Сенгера. Решение проблемы белка стараются отгадать, а не получить в результате исследования по тщательно продуманному плану, основанному на всестороннем анализе опытных данных, оригинальных методиках и нетривиальном подходе.

Обнаруженные при анализе рентгеноструктурных моделей белков факты, касающиеся распределения аминокислотных остатков в глобуле, оказались очень важными, поскольку они приближали к истинному пониманию структурной организации белковых молекул хотя бы уже тем, что давали возможность увидеть реальное положение и обнаружить несостоятельность существовавших на этот счет представлений. Общая структура свернутого белка исключительно компактна. Например, полностью вытянутая цепь панкреатического трипсинового ингибитора (58 остатков) имеет длину 211 Å (~3,6 Å на остаток), а максимальный габаритный размер свернутого белка равен около 29,0 Å.

Карбоксипептидаза, состоящая из 307 аминокислотных остатков, в вытянутой форме имеет длину 1114 Å, а в свернутой — 50,0 Å. Количественные исследования кристаллографических моделей белков позволили получить новые опытные данные об упаковке атомов в глобуле и атомной плотности белковых молекул. Нативное состояние белковой молекулы имеет высокий коэффициент упаковки, в среднем 75% (с вариацией от 68 до 82%, М. Кляйпер [21] и Б. Ли и Ф. Рихардс [10]). Для сравнения отметим, что у правильных сферических тел этот коэффициент равен 74%, а у молекул жидкой воды и жидкого циклогексана составляет 58 и 44% соответственно. По плотности упаковки белки близки кристаллам малых органических молекул (70—78%), связанных между собой дисперсионными, лондоновскими силами. Из-за высокой плотности упаковки белки отличаются слабой сжимаемостью. Так, их коэффициент сжимаемости в 20 раз меньше, чем у масла, и практически совпадает с коэффициентом сжимаемости олова и каменной соли. Плотность белка неодинакова во всех частях глобулы. У. Козман и соавт. [22], например, нашли, что плотность центральной части ниже кажущейся плотности белковой молекулы в растворе. Это наблюдение, однако, имеет частный характер. Низкая плотность и даже "пустоты", т.е. области, не заполненные атомами белка, встречаются в различных частях глобулы. Как правило, в них находятся единичные молекулы воды, связанные с аминокислотными остатками водородными связями. Молекулы H_2O обнаруживаются рентгеноструктурным анализом и составляют с белком как бы единое целое. Интересно, что белки, содержащие большое число дисульфидных связей, не отличаются повышенными коэффициентами упаковки и большей плотностью.

Полипептидная цепь в состоянии статистического клубка характеризуется большой гибкостью. Обычно полагают, что аминокислотный остаток в свободном состоянии обладает в среднем десятью приблизительно равновероятными конформациями. В нативной структуре белка у каждого остатка из них реализуется одна конформация, а в статистическом клубке могут попеременно присутствовать все десять. Поэтому у развернутой полипептидной цепи возможно огромное количество изоэнергетических конформаций, состоящих только из самых предпочтительных состояний остатков (приблизительно 10^n , где n — число остатков в цепи). К. Тэнфорд [23] и П. Флори [24] полагают, что денатурированный белок является правильным статистическим клубком.

В какой степени состояние полностью денатурированного белка отличается от аналогичного состояния модельных гомополипептидов и низкомолекулярных соединений, от модели классического идеального статистического клубка? Характерные особенности последнего заключаются в том, что даже смежные звенья полимера не взаимодействуют между собой, одинаково доступны растворителю и постоянно флуктуируют случайным образом в результате собственного броуновского теплового движения, так что конформация макромолекулы непрерывно меняется. По данным А. Гвидта и С. Нильсена [25], в молекуле рибо-

нуклеазы А с восстановленными остатками цистеина совершается полный обмен всех обмениваемых протонов с той же скоростью, что и у модельных пептидных соединений. Исследования У. Харрингтона, Дж. Шеллмана, К. Тэнфорда и других показали, что и физические свойства белка с разрушенными дисульфидными связями отвечают свойствам статистического клубка; это подтверждается также тем фактом, что свойства не меняются при добавлении сильнейшего денатуранта — гуанидингидрохлорида. Однако, как и во многих других случаях, в отношении белков рискованно делать слишком определенные и обобщающие заключения. Так, согласно данным Т. Крейтона [26], шесть сульфгидрильных групп восстановленных остатков Cys в панкреатическом трипсиновом ингибиторе обладают одинаковыми химическими свойствами и реагируют, например, с йодацетатом с той же скоростью, что и модельные меркаптаны. Таким образом, поведение денатурированного белка как будто бы аналогично поведению развернутой цепи рибонуклеазы, тем не менее более тонкое исследование с использованием спектров ЯМР показало, что только разрывы дисульфидных связей трипсинового ингибитора недостаточны для его полной денатурации с исчезновением всех структурированных элементов нативной конформации или вновь образованных. Г. Снайдер и соавт. [27], например, обнаружил у всех четырех остатков тирозина белка, лишённого дисульфидных связей, неэквивалентное окружение. Следовательно, трипсиновый ингибитор, денатурированный только путем восстановления атомов серы, не соответствует состоянию с полностью развернутой цепью и тем более состоянию статистического клубка. По спектрам ЯМР, реагирующим на развертывание цепи сужением линий протонного резонанса, было найдено, что денатурированный химотрипсиноген имеет значительно меньшую скорость катализируемого обмена протонов, чем малые молекулы, которые можно рассматривать как модель истинного полного развертывания. Наблюдение было объяснено неодинаковыми условиями проникновения обменивающихся атомов в места протонного обмена. К. Тэнфорд утверждает, что только в очень концентрированных водных растворах гуанидингидрохлорида полипептид действительно принимает состояние, определяющееся произвольным набором конформаций [23]. В любом случае вода является плохим растворителем для развернутого полипептида. В этом состоянии аминокислотная последовательность легко осуществляет экспериментально обнаруживаемые внутримолекулярные взаимодействия, прежде всего, за счет дисперсионных контактов, а также электростатики и водородных связей. Конечно, такие взаимодействия не столь эффективны и менее стабильны по сравнению с нативным состоянием, но и здесь они создают плотную, постоянно мигрирующую сетку межостаточных взаимодействий.

Для того чтобы клубок был действительно статистическим, нужно чтобы вращения вокруг ординарных связей основной и боковой цепей аминокислотной последовательности происходили независимо и в той же мере свободно, как у модельных малых молекул. В свою очередь, это возможно только при условии одинаковой эффективности межмоле-

кулярных и внутримолекулярных взаимодействий и отсутствия избирательности во взаимодействии молекул растворителя с разнообразными по своей природе аминокислотными остатками. Очевидно, полностью удовлетворить подобным условиям (и, следовательно, привести белковую цепь в состояние истинного статистического клубка) не может ни одна среда.

Для оценки размеров конформационных изменений при денатурации белков наиболее удобной характеристикой является энтропия. Чем больше развернулась белковая цепь, чем резче переход порядок—беспорядок и чем ближе состояние цепи подошло к статистическому клубку, тем выше значение энтропии. В отношении этого фактора два рассматриваемых нами термодинамических состояния находятся как бы на разных полюсах. Однако в системе белок—среда возрастание конформационной энтропии при разворачивании полипептидной цепи в значительной степени компенсируется ее отрицательным изменением вследствие погружения неполярных атомных групп в воду (эффект гидрофобных взаимодействий). Среднее изменение конформационной энтропии в расчете на один остаток при переходе из нативного состояния в денатурированное колеблется от 2 до 6 ккал/(моль·град) [28—30]. По существу, эта величина составляет энтропийную стабилизацию развернутого состояния. Устойчивость компактной глобулы характеризует энтальпия. По данным С. Чотиа [12], среднее значение изменения энтальпии на один остаток при том же переходе составляет 2,5—3,0 ккал/моль. Для нативной конформации лизоцима была получена общая энергия стабилизации 28—36 ккал/моль, причем наиболее существенный вклад (около половины) вносят гидрофобные взаимодействия. Разность свободной энергии между нативным состоянием и денатурированным, или общая стабильность функционирующего в физиологических условиях белка, составляет, согласно К. Тэнфорду [31], К. Пейсу [32] и П.Л. Привалову [33], от 4,0 до 15,0 ккал/моль. Это есть малая разность больших чисел.

Р. Ламри и Р. Билтонен приводят следующие термодинамические характеристики устойчивости химотрипсина, которые авторы считают типичными для глобулярных белков [20]. Свободная энергия разворачивания белка при рН 3,0 и 27° равна около 7,0 ккал/моль (при рН 7,0 равна 14,0 ккал/моль). Эта величина складывается из изменения энтальпии в 6,0 ккал/моль, которая включает изменение энергии внутримолекулярных (–183,0 ккал/моль) и межмолекулярных (123,0 ккал/моль) взаимодействий, и изменения энтропии в 170 ккал/(моль·град). Энтропийный фактор (– $T\Delta S$) также имеет два члена: конформационный, внутренний (–363 ккал/моль), и гидрофобный, внешний (320 ккал/моль).

К. Пейс исследовал гидрохлоридгуанидиновую денатурацию у ряда белков при различных значениях рН [32]. На основе полученных данных автор рассчитал свободную энергию денатурации, приведенную к нулевой концентрации денатуранта. Найденная свободная энергия миоглобина (рН 6,0), миоцима (рН 2,9), α -химотрипсина (рН 4,3), рибонуклеазы (рН 6,6) и β -лактоглобулина (рН 3,2) имела следующие

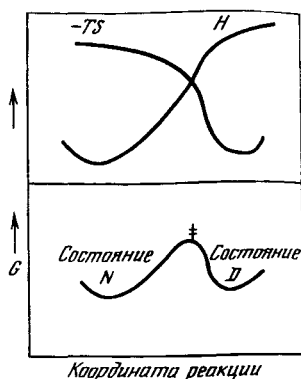
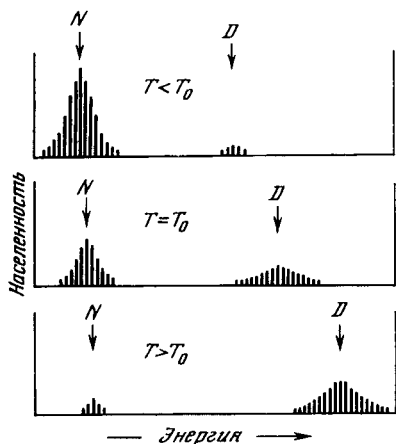
значения: 8,5; 9,5; 12,0; 16,0 и 22,0 ккал/моль соответственно. Приведенные белки, очевидно, не были отобраны в процессе эволюции по максимальной стабильности, поскольку реализация их функций, как правило, требует определенной подвижности. Во всяком случае, синтетические белки, сконструированные эмпирически, обладают значительно большей стабильностью [34].

11.2. МЕТАСТАБИЛЬНЫЕ СОСТОЯНИЯ

Выше были рассмотрены некоторые свойства двух предельных, термодинамически стабильных состояний природных аминокислотных последовательностей: нативного и полностью денатурированного. Оба конформационных состояния рассматривались независимо друг от друга; сравнивались лишь физические и химические свойства белковой цепи в различных состояниях. Теперь необходимо раскрыть связь между этими состояниями и понять те события, в которых участвует белковая цепь на пути от нативной трехмерной структуры к статистическому клубку или в противоположном направлении, поскольку переход во многих случаях является обратимым ($N \rightleftharpoons D$). В данном разделе обсуждаются главным образом экспериментальные исследования процесса денатурации белков.

Термодинамические аспекты. Изучение денатурации привело в начале 1970-х годов к доказательству того, что сборка трехмерной структуры глобулярных белков представляет собой самопроизвольно протекающий, быстрый и безошибочный процесс. Утвердилось представление, что он термодинамически обратим, относится к переходам первого ряда и описывается равновесной термодинамикой и статистической физикой. Нативное состояние белка имеет наименьшую свободную энергию Гиббса, т.е. является глобальным, в физиологических условиях, а термодинамически устойчивое состояние статистического клубка глобально в условиях полной денатурации.

Первой теоретической трактовкой экспериментальных данных о денатурации белков явилась разработанная Дж. Брандтсом в 1964 г. термодинамическая теория двух состояний [35]. Согласно этой теории, белковая молекула в растворе представлена целым рядом (в общем случае неограниченным) микросостояний. Все они входят в состав либо распределения N (нативное макросостояние белка), либо D (денатурированное макросостояние). Состояния N и D характеризуются усредненным по всем макросостояниям параметром $\bar{\alpha}$, являющимся количественным выражением различных физических или химических свойств белка. На рис. III.1 приведено графическое изображение процесса тепловой денатурации белка, отвечающего переходу между двумя состояниями и, следовательно, описывающегося теорией Брандтса. Энергетическая шкала охватывает всю систему белок—растворитель. Теория Брандтса сделала возможным относительно простой термодинамический анализ конформационного перехода $N \rightleftharpoons D$. Используя экспе-



Р и с. III.1. Графическое изображение процесса денатурации белка

N и D — термодинамические состояния нативного и денатурированного белка, определяемые равновесным распределением микроскопических состояний [35]

Р и с. III.2. Изменение энтальпии (H), энтропии (S) и свободной энергии Гиббса (G) в процессе развертывания белковой цепи химотрипсина А [20]

риментальные данные о переходе и трактуя их в свете теории двух состояний, можно построить диаграммы изменений свободной энергии, энтальпии и энтропии как функции координаты реакции. На рис. III.2 приведена такая диаграмма для химотрипсина, построенная Р. Ламри и Р. Билтоном [20] по данным М. Айзенберга и Г. Шверта [36] и Дж. Брандтса [37]. Из диаграммы следует, что в процессе денатурации белка происходит монотонное изменение энтальпии и энтропии. В связи с тем, что только два макросостояния представлены большими популяциями на пути перехода от N к D, то все промежуточные состояния должны обладать высокой свободной энергией Гиббса. В наличии одного знака и близких значений изменений ΔH и $T\Delta S$ Ламри и Билтон видят характерную и существенную особенность структурной организации белков.

Денатурационная теория белков Брандтса, как отмечалось, основана на идее наличия двух состояний, каждое из которых представлено определенным распределением своих микросостояний. Теория позволяет предсказать свойства макросостояний в области перехода в предположении, что микросостояния, реализующиеся в этой области, не являются чем-то вновь созданным, а присутствуют в распределении N и D. В теории постулируется отнюдь не очевидное положение об отсутствии новых промежуточных конформационных состояний в области перехода. В связи с этим в каждом конкретном случае требуется критическое отношение к возможности описания процесса денатурации с помощью теории двух состояний. В общем случае, когда переход не отвечает схеме двух состояний, не должно быть совпадения значений изменения энтальпии ($\Delta H'$), рассчитанной, согласно Вант-Гоффу, по температур-

ной зависимости константы равновесия двухстадийной реакции, истинным калориметрическим тепловым эффектом денатурации (ΔH).

О соответствии системы двухфазной концепции реальной ситуации может свидетельствовать форма кривых зависимости, например ΔH от температуры. Если система не отвечает теории Брандтса, то для кривых становится характерным наличие резко выраженного максимума в области перехода. Несмотря на то, что к началу 1970-х годов было уже проанализировано большое число реакций свертывания и разворачивания белковой цепи с применением методов, основанных на теории Брандтса, тем не менее не удалось выработать определенного представления об общем для денатурации термодинамическом механизме процесса. Наиболее трудным оказалось получить в каждом отдельном случае однозначные доказательства принадлежности процесса к действительно простому переходу между двумя состояниями, поскольку нельзя исключить возможность случайного соответствия опытных данных с теоретическими. Дж. Брандтс считает, что имеется, по крайней мере, два примера, где соответствие схеме двух состояний продемонстрировано убедительно. Один касается денатурации миоглобина, а другой — рибонуклеазы. Исследование процесса свертывания цепи миоглобина Дж. Германсом и Г. Акампорой приводит к практически полному совпадению рассчитанных и опытных значений термодинамических параметров [38]. У рибонуклеазы совпадают величины ΔH° и ΔC_p тепловой денатурации белка при 45°, полученные прямым калориметрическим определением (86,0±4,0 ккал/моль; 2300±300 ккал/моль·град) и расчетом с использованием данных УФ-спектров, основанным на идее двух состояний (89,0 ккал/моль; 2260 ккал/моль·град).

К заключению о правомерности использования модели двух состояний склоняют также данные прецизионных измерений П.Л. Привалова и Н.Н. Хечинашвили тепловых эффектов (ΔH) тепловой денатурации метмиоглобина, α -химотрипсина, рибонуклеазы, лизоцима и цитохрома с [39]. Для этих белков отношение $\Delta H'/\Delta H$ ($\Delta H'$ — зависящая от принятой модели вант-гоффовская энтальпия) равно 1,05±0,03. Отклонение весьма незначительно, и поэтому денатурацию пяти белков можно рассматривать в первом приближении как кооперативный переход между двумя количественно разными макроскопическими состояниями, при котором промежуточные формы неустойчивы и присутствуют в незначительных количествах. Двухстадийный процесс денатурации, согласно П.Л. Привалову [40] и Т. Крейтону [18], обычно имеет место у однодоменных белков.

Хотя многие данные о денатурации различных белков как будто бы не противоречат теории Брандтса и модели двух состояний, тем не менее это приближение нельзя считать заведомо удовлетворительным при исследовании новых объектов. Не следует также переоценивать значения совпадений экспериментальных и расчетных термодинамических параметров. Нужно не забывать, что подход Брандтса является термодинамическим и, следовательно, феноменологическим и, как таковой, не может дать на основе статистических характеристик деталь-

ного описания конкретного механизма денатурации любого белка. Как отмечают Ламри и Билтонен: "Специальный подход с моделями, развитый Брандтсом, является не столько теорией, сколько полуэмпирическим методом анализа изменений термодинамических величин во время перехода между двумя состояниями (т.е. строго кооперативного) в белках" [20. С. 71].

Известны случаи прямого, вполне очевидного несоответствия процесса денатурации двухстадийному приближению. Это проявляется, например, у карбоангидразы при ее денатурации гуанидингидрохлоридом в различном характере экспериментальных кривых и типичных для двухстадийного процесса зависимостей [41]. У стафилококковой пенициллиназы отклонения от модели Брандтса обнаруживаются в несопадении характера изменений при денатурации различных физических параметров. Так, если судить по вязкости и УФ-поглощению, белок совершает свой единственный конформационный переход и полностью денатурирует при 0,5 М гуанидингидрохлорида, а согласно спектрам дисперсии оптического вращения (ДОВ), первые конформационные изменения происходят только при 1,5 М концентрации того же денатуранта. Проводившие эти исследования Б. Робсон и Р. Пейн сделали вывод, что в интервале концентраций 0,5—1,5 М гуанидингидрохлорида в растворе существует в заметном количестве третье промежуточное конформационное состояние белка [42].

Отклонение процесса денатурации от схемы двух состояний может быть не только истинным, но и кажущимся, хотя сделать здесь однозначное отнесение не всегда представляется возможным. Если, например, конформация белка включает несколько доменов, то их развертывание при денатурации может происходить последовательно, в значительной степени независимо и с разной скоростью. Денатурация мультисубъединичных белков, имеющих четвертичную структуру, обычно начинается с диссоциации и их последующего развертывания [43, 44]. Усложняют процесс денатурации и затрудняют его интерпретацию также межмолекулярная ассоциация и выпадение в осадок развернутых белковых цепей, что часто происходит в слабоденатурирующей среде. В результате образуется третье состояние белка. Подобным образом ведут себя карбоангидраза и стафилококковая нуклеаза, развертывающиеся при малой концентрации гуанидингидрохлорида и необратимо денатурирующие из-за малой растворимости в этих условиях. Еще одна причина сложности процесса денатурации может заключаться в неоднородности молекулярной организации белка (в присутствии других белков или молекул в ассоциированном состоянии), которая имеет место или с самого начала, или возникает в процессе развертывания. Известным примером такого рода является овальбумин. Сложный характер его перехода $N \rightleftharpoons D$ впервые был отмечен Р. Симпсоном и У. Козманом в 1953 г. и в течение более двадцати лет не мог быть объяснен [45]. Оказалось, что белок состоит из трех фракций, четко разделяемых электрофоретически, содержащих разное число (от 0 до 2) ковалентно связанных фосфатных групп. При исследовании фракций в

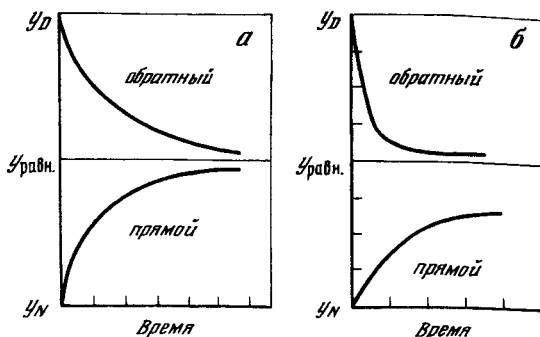
чистом виде отклонений от двухстадийного процесса не наблюдалось [46].

Кинетические аспекты. Трудно представить, что белки могут принимать нативную физиологически активную конформацию, сворачиваясь случайным образом по принципу "проб и ошибок". Даже в условиях *in vitro* самопроизвольная сборка трехмерной структуры белка, не содержащего дисульфидных мостиков, происходит настолько быстро, что дает основание допустить во много раз большую скорость этого же процесса в условиях *in vivo* по сравнению со скоростью рибосомального матричного синтеза аминокислотной последовательности. Создание за считанные секунды из развернутой полипептидной цепи трехмерной структуры макромолекулы возможно только при высокой степени кооперативности процесса. Естественно было ожидать, что кинетика этого процесса будет соответствовать такому механизму ренатурации белка, при котором происходящие на каждом участке последовательности события увеличивают вероятность и, следовательно, скорость последующей укладки всех отдельных участков цепи в направлении правильной нативной конформации. Данному условию удовлетворяет самый простой механизм самоорганизации белков, включающий единственный переход между двумя состояниями ($N \rightleftharpoons D$). Согласно теории этого процесса, которая только что была рассмотрена, никакие другие состояния белковой цепи, кроме *N* и *D*, не присутствуют в экспериментально обнаруживаемых количествах в течение всего времени прямой ($N \rightarrow D$) и обратной ($N \leftarrow D$) реакций. Если разворачивание и свертывание белковой цепи действительно следуют двухстадийному процессу, то изучение кинетики и выяснение деталей конкретного механизма денатурации и ренатурации сталкивается с особенно серьезными трудностями. Они вызваны большими скоростями реакции и малыми концентрациями промежуточных состояний, а это требует быстрореагирующей и высокочувствительной экспериментальной техники. Наиболее часто используются спектральные методы (ЯМР, КД, УФ), ферментативный гидролиз, иммунологические методы. Для быстрой остановки процесса применяются методы стоп-флоу.

В первых кинетических исследованиях денатурации белков в 1968 г. Ф. Поул [47] и К. Тэнфорд [23, 48] не обнаружили промежуточных продуктов; кинетика процесса полностью отвечала переходу между двумя состояниями в соответствии с теорией Дж. Брандтса. Более сложное кинетическое поведение белков при денатурации удалось наблюдать в 1971 г. А. Икаи и К. Тэнфорду при изучении скорости свертывания и разворачивания полипептидных цепей лизоцима и цитохрома *c* с использованием техники стоп-флоу и УФ-спектроскопии [49]. Полученные зависимости интенсивности поглощения (y) от времени для двух белков приведены на рис. III.3. Кривые прямого и обратного процессов у лизоцима (рис. III.3,а) симметричны относительно $u_{\text{равн}}$ и соответствуют приведенному выше уравнению реакции первого порядка. Кривые же цитохрома *c* (рис. III.3,б) не отвечают теории двух-

Р и с. III.3. Кривые реакции денатурации и ренатурации лизоцима (а) и цитохрома с (б) в 2,5 М растворе гуанидингидрохлорида, 25°, рН 2,6 (а) и 6,5 (б)

По ординатам отложены коэффициенты экстинкции полос поглощения 301 нм (а) и 400 нм (б) для нативных (y_N) и денатурированных (y_D) состояний белков; параметр уравн. отвечает условию равновесия $D/N=1$ [49]



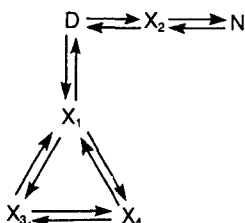
фазного процесса и свидетельствуют о наличии в области перехода значительного количества помимо N и D еще одного состояния X. А. Икаи и К. Тэнфорд приходят к нетривиальному заключению и вводят понятие о таком промежуточном состоянии, которое, являясь частично свернутой формой, в то же время не может трансформироваться непосредственно в N без предварительного развертывания. Иными словами, это состояние представляет собой "неправильно" свернутую конформацию белковой молекулы. Простейший механизм, отражающий такого рода взаимоотношения между состояниями белка в процессе его денатурации, может быть записан в виде $N \rightleftharpoons D \rightleftharpoons X$. Согласно этой формуле первые шаги в свертывании полипептидной цепи, находящейся в состоянии статистического клубка, должны быть строго обратимыми и не влиять на конечный результат. Чем обусловлен такой не прямой путь свертывания белка в правильную нативную конформацию? По мнению авторов, он необходим *in vitro*, поскольку в этих условиях процесс может начаться на любом участке несвернутой полипептидной цепи, в то время как *in vivo* он начинается со свертывания N-концевой части (в предположении, что укладка белковой цепи в нативную конформацию происходит у N-конца еще до окончания синтеза).

Теперь можно сопоставить результаты термодинамического и кинетического исследования денатурации лизоцима и цитохрома с. П.Л. Привалов и Н.Н. Хечинашвили не выявили различия в механизме свертывания и развертывания этих белков [39]. Наблюдая хорошее совпадение вант-гоффовской энтальпии и тепловых эффектов, авторы сделали заключение об одинаковом механизме денатурации лизоцима и цитохрома с и соответствии механизма модели двух состояний. Кинетическое исследование денатурации этих же белков Икаи и Тэнфордом с использованием гуанидингидрохлорида, независимо от отношения к трактовке авторов полученных данных, не дает оснований для такого вывода. Расхождение в термодинамической и кинетической оценках механизма денатурации цитохрома с тем более существенно, что, как было показано позднее Т. Тсонгом, этот белок даже в концентрированном растворе гуанидингидрохлорида не полностью денатурирован,

в то время как под действием температуры его денатурация идет до конца [50].

Тщательное параллельное изучение кинетических аспектов конформационных изменений и ферментативной активности при денатурации шести белков (фумаразы, энлазы, альдолазы, глицеральфосфатдегидрогеназы, лактатдегидрогеназы и малатдегидрогеназы) было предпринято в 1971 г. Дж. Тейпелем и Д. Кошландом [51]. Для каждого объекта исследовано влияние на кинетику свертывания фермента и восстановление его биологической функции наличия в растворе соответствующего субстрата или кофактора (S), изменения ионной силы молекулы и концентрации. Заключение о конформационных изменениях делались по данным кривых дисперсии оптического вращения ферментов, показывающих характерный для них отрицательный эффект Коттона при 232—234 нм, и спектров флуоресценции в области 300—400 нм.

Принципиальная схема повторного свертывания денатурированных белков *in vitro*, к которой Тейпель и Кошланд пришли на основе собственных экспериментальных данных и анализа имеющегося в литературе материала, отвечает следующей формуле:



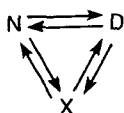
Эта формула сложнее формулы процесса денатурации цитохрома *c* по Икаи и Тэнфорду [49]. Однако принципиальных противоречий между ними нет. Обе они не согласуются с теорией Брандтса, рассматривающей два состояния.

Относительно быстрая реставрация структуры ферментов по сравнению с медленным восстановлением их биологической активности показывает, что промежуточные конформационные состояния образуются в заметных концентрациях. Тот факт, что полученные на разных стадиях ренатурации спектры ДОВ и спектры флуоресценции не имеют изобестической точки, совпадающей с пересечением спектральных кривых состояний N и D, свидетельствует о том, что все промежуточные состояния одновременно присутствуют в растворе и находятся в равновесии. Условия окружения, а именно: наличие или отсутствие специфических субстратов или кофакторов, их концентрация, значения pH раствора, ионной силы и концентрация белка, существенно влияют на скорость пространственной организации молекулы и на ее биологическую активность. Анализ полученных данных привел авторов к выводу, что свертывание фумаразы, энлазы и альдолазы определяется прежде всего термодинамическими факторами, а у трех других белков существенно влияние также кинетических факторов. У предста-

вителя первой группы переходы между всеми промежуточными состояниями и обретение белком термодинамически самой стабильной трехмерной структуры достигаются значительно быстрее, чем у представителей второй группы. В этом случае слабее кооперативность процесса структурной самоорганизации и путь к нативной конформации более сложен и длителен.

Дж. Тейнелем и Д. Кошландом было обнаружено, что скорость восстановления структуры белков *in vitro* больше скорости синтеза полипептидов *in vivo*, включающего собственно химическую часть и укладку трехмерной структуры [51]. Биологическая активность при ренатурации восстанавливается значительно медленнее, чем при биосинтезе. Авторы предполагают, что свертывание *in vivo* исключает образование предшественников, которые слишком медленно трансформируются в активный белок.

Г. Эпштейн и соавт. [52] исследовали кинетику свертывания кислой стафилококковой нуклеазы до нативного состояния путем нейтрализации в стоп-флуо спектрофотометре, измеряя флуоресценцию триптофановой боковой цепи. Общая кинетическая модель, к которой приходят авторы после анализа полученных данных, сводится к следующей формуле процесса денатурации:



Измерения кинетики свертывания белка в интервале 13—38° позволили обнаружить протекание у него двух процессов, отличающихся друг от друга кинетически и физически. Один из них, более быстрый, не подвержен в исследованной области заметному влиянию температуры, а другой, напротив, существенно зависит от нее. Первый процесс, происходящий в начале свертывания, авторы связывают с образованием зародышевых структурных форм, а следующий за ними процесс — с образованием гидрофобных областей и укладкой белковой цепи в компактную глобулярную форму. Меньшая скорость второго процесса обусловлена большей высотой энтропийного барьера по сравнению с барьером на начальном этапе структурирования цепи.

При исследовании термодинамики и кинетики денатурации рибонуклеазы А Т. Тсонг и соавт. [53] столкнулись с парадоксальной ситуацией, причем, уже встречавшейся при изучении денатурации цитохрома с. С одной стороны, термодинамика свертывания белка в нейтральной среде показывает отклонение, а в кислой — близкое соответствие двухфазному процессу ($N \rightleftharpoons D$). С другой стороны, кинетика разворачивания рибонуклеазы А в этих условиях свидетельствует об обратном. Попытка объяснить наблюдаемое несоответствие термодинамических и кинетических данных привела Тсонга и соавторов к разработке так называемой постадийной модели свертывания и разворачивания белка, претендующей на обобщение известных фактов о денатурации.

В предложенной модели чувствуется стремление авторов сохранить трактовку этих фактов с позиции теории двух состояний. Развертывание нативной конформации белка, согласно постадийной модели, состоит из двух фаз: начальной и завершающей, которая, в свою очередь, может включать последовательный ряд стадий. Процесс деградации глобулярной нативной конформации до развернутой белковой цепи, на отдельных участках которой имеются зародышевые формы — элементарные структурные элементы белка, отнесен авторами к наиболее высококооперативным. Он проходит за период времени, на несколько порядков меньший по сравнению с последующим периодом разрушения зародышевых нуклеаций. Таким образом, процесс денатурации согласно Тсонгу и соавторам описывается формулой $N \rightleftharpoons X \rightleftharpoons D$, причем стадия $N \rightleftharpoons X$ является быстрой, а $X \rightleftharpoons D$ — медленной.

Последующее изучение ренатурации рибонуклеазы А Дж. Гарелом и Р. Болдвином привело к еще одному неожиданному результату [54]. Оказалось, что как быстрая, так и медленная стадии этого процесса принадлежат нативной конформации белка, что никак не соответствовало постадийной модели и механизму денатурации с X-состоянием, промежуточным между N и D. Позже Гарел и Болдвин пришли к заключению, что двухстадийная кинетика денатурации рибонуклеазы вызвана наличием в равновесии двух взаимно превращающихся состояний несвернутого белка (D_1 и D_2), которые практически неразличимы для физико-химических методов [55, 56]. Относительное содержание D_1 и D_2 не изменялось при варьировании концентрации гуанидингидрохлорида и значений pH раствора, что указывало на их принадлежность к предельно развернутому состоянию белковой цепи. Процесс денатурации, по Гарелу и Болдвину, идет по формуле $N \rightleftharpoons D_2 \rightleftharpoons D_1$ с быстрой стадией $N \rightleftharpoons D_2$ и медленной $D_2 \rightleftharpoons D_1$.

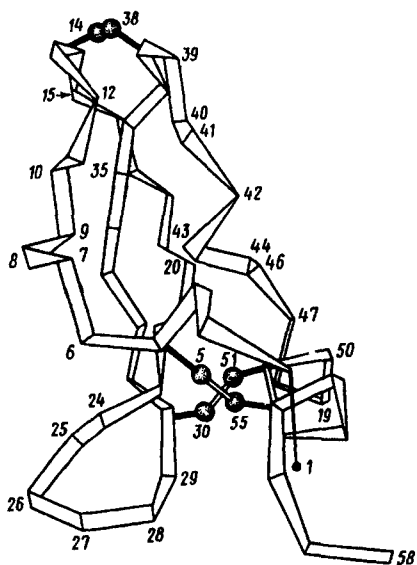
Что же собой могут представлять две полностью развернутые формы одного белка? Могут ли вообще отличаться флуктуирующие клубки одной и той же аминокислотной последовательности? Для положительного ответа на поставленные вопросы, по-видимому, существовал лишь один шанс и им воспользовались Брандтс и соавт. [57]. Состояния D_1 и D_2 могут отличаться, оставаясь при этом статистическими образованиями, конфигурационной топологией полипептидной цепи, связанной с возможностью пептидной группы принимать *транс*- и *цис*-форму. В состоянии D_2 , как и в N, все группы имеют *транс*-конфигурацию, а в состоянии D_1 определенная часть пептидных групп находится в *цис*-конфигурации. Наиболее вероятна конфигурационная изомеризация у групп, соединяющих остаток пролина с предшествующим остатком.

РЕНАТУРАЦИЯ ЦИСТЕИНСОДЕРЖАЩИХ БЕЛКОВ

Логические и, как правило, фактические пути решения многих фундаментальных проблем, а также становление и развитие целых областей естественнонаучных знаний показывают, что почти всегда источником и основой крупного научного достижения являются результаты исследования простейшего объекта, сфокусировавшего в себе самые важные и характерные черты рассматриваемого явления. Вспомним, что становление подлинно научной генетики в значительной мере обязано выбору Г. Менделем объектом своего исследования гороха. Хорошо также известно, какой крупной удачей для развития биологии, прежде всего хромосомной теории наследственности Т. Моргана, учения Г. де Фриза о мутациях и обоснования генетических принципов эволюции, явился один только факт выбора в качестве объекта исследования плодовой мушки — дрозофилы. Не менее важную роль для становления и развития молекулярной биологии в целом и особенно молекулярной генетики, а в последнее десятилетие генетической инженерии сыграло использование фага штамма *E. coli*.

А как обстоит дело с выбором объекта в изучении проблемы структурной организации белков и, в частности, в важной ее составной части — задаче свертывания и разворачивания белковой цепи? Находится ли в центре большого количества работ в этой области изучение простейших белков, которое постоянно стимулирует и направляет исследования более сложных и определяет их возможности? Хотя среди множества изучаемых белков, безусловно, есть и простейшие, однако нельзя сказать, что они находятся в центре внимания, и решение структурных проблем белка, как и отдельных задач проблемы, сознательно строится по определенной программе. С этих позиций и будут рассмотрены последующие работы по денатурации белков. Однако предварительно необходимо оговориться, что в данном случае следует понимать под простейшим, модельным объектом и каким требованиям он должен отвечать. Модельный белок, по-видимому, должен быть низкомолекулярным. Но не все белки с короткой цепью могут считаться простейшими, особенно в отношении их денатурационных свойств. Например, один из самых маленьких белков — инсулин — совсем не является простым и типичным и, согласно К. Анфинсену и соавт. [58], при разрушении дисульфидных связей не ренатурирует. Это связано с тем, что инсулин образуется путем протеолитического расщепления проинсулина и содержит две цепи. Следовательно, белок должен быть не только низкомолекулярным, но состоять из одной цепи. Желательно также, чтобы цепь свертывалась в глобулярную форму, представляющую собой один домен.

Структура белка, выбранного в качестве центрального объекта исследования явления денатурации, непременно должна содержать несколько дисульфидных связей. В настоящее время эти связи служат



Р и с. III.4. Трехмерная структура пептидного остова бычьего панкреатического трипсинового ингибитора

если не единственным, то во всяком случае самым надежным источником структурной информации о промежуточных метастабильных состояниях. Кроме того, возможность контролировать кинетику и термодинамику дисульфидного взаимодействия позволяет определить кинетические роли промежуточных состояний. Знание внутримолекулярных преобразований соответствующих дисульфидных связей даст представление о конформационных переходах, ведущих к нативной структуре белка. Дисульфидные связи особенно полезны, когда белок денатури-

рует при их разрыве. В этом случае не требуются денатуранты и сохраняются все виды взаимодействий, определяющих стабилизацию белковой глобулы. Таким образом, типичный белок должен быть низкомолекулярным, состоять из одной цепи и иметь однодоменную, известную, с хорошим разрешением трехмерную структуру, содержащую дисульфидные связи. Желательно, чтобы выбранный белок был простейшим и типичным при изучении не только денатурации, но и других свойств. Например, для выяснения принципов пространственной организации белков важны количественные оценки основных факторов стабилизации двух часто встречающихся регулярных форм пептидной цепи: α -спирали и β -структуры. Понимание структурной организации белковых молекул необходимо для последующего изучения их биологического действия и установления связи между структурой и функцией. Для обеспечения преемственности знаний важно, чтобы белок, выбранный в качестве простейшего для исследования структурной организации, оказался модельным и для исследования структурно-функциональной организации. Для этого он должен обладать простой и хорошо изученной экспериментальной функцией.

Отмеченным выше требованиям удовлетворяет бычий панкреатический трипсиновый ингибитор (БПТИ). Решающее значение в выборе этого белка как тест-объекта при рассмотрении денатурации и ряда других свойств сыграло то обстоятельство, что молекула БПТИ экспериментально и теоретически изучена более глубоко и всесторонне, чем многие другие белки. Не будет большим преувеличением сказать, что уровень исследования БПТИ во многом определяют экспериментальные и теоретические возможности естествознания в изучении бел-

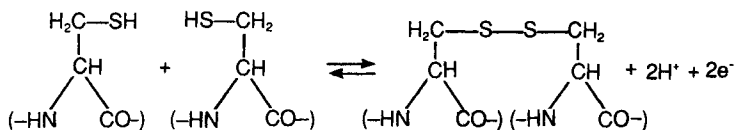
ковых молекул. Что же касается денатурации, то предпринятое Крейтоном [59] еще в 1978 г. изучение механизма свертывания и развертывания полипептидной цепи БПТИ и сегодня опережает аналогичные работы по другим белкам.

Аминокислотная последовательность БПТИ из 58 остатков была установлена Б. Касселем и М. Ласковским [60]; трехмерная структура белка с разрешением 1,9 Å получена Р. Хубером и соавт. [61] в 1974 г. и вскоре уточнена до 1,5 Å Дж. Дайзенхофером и У. Стейгеманом [62]. Белок включает шесть остатков Cys, которые образуют три дисульфидные связи: Cys-5–Cys-55, Cys-14–Cys-38 и Cys-30–Cys-51. Схематически трехмерная модель пептидного остова молекулы БПТИ показана на рис. III.4.

Для поиска, фиксации и установления структуры промежуточных состояний, которые и определяют основные этапы пути укладки белковой цепи, исключительное значение, как уже подчеркивалось, имеют остатки цистеина, точнее, их способность обратимо и легко переходить в содержащий дисульфидную связь димерный остаток цистина.

12.1. ДИСУЛЬФИДНЫЕ СВЯЗИ В БЕЛКАХ

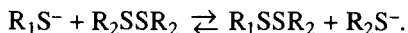
Остатки цистеина и цистин легко переходят друг в друга по схеме:



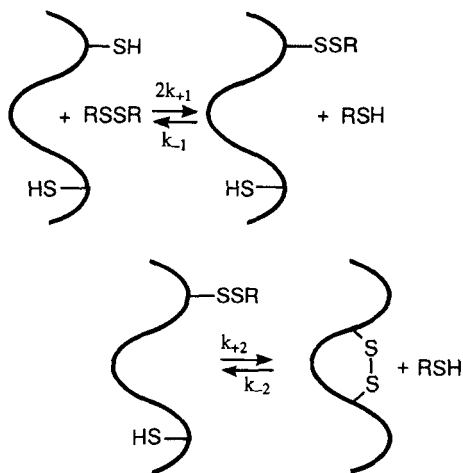
Превращение двух сульфгидрильных, или тиольных, групп в дисульфидную представляет собой окислительно-восстановительную реакцию, чувствительную к присутствию в растворе акцептора (донора) электронов. Для кинетического изучения денатурации особенно важно то обстоятельство, что взаимодействия остатков Cys в белковой молекуле определяются не столько различиями в химических свойствах их сульфгидрильных групп (они, как правило, незначительны), сколько стереохимическими факторами и конформационными возможностями полипептидной цепи. Скорость образования S–S-связи между любой парой остатков цистеина зависит исключительно от их взаимного расположения в пространстве и, следовательно, может являться количественной характеристикой вероятности соответствующих конформационных переходов. Идентификация дисульфидной связи ведет к обнаружению конформации, обеспечивающей ее образование. Термодинамическое условие состоит в том, что конформационное состояние белковой цепи, стабилизирующее данную дисульфидную связь, должно в той же степени быть стабилизировано наличием этой связи. Следовательно, конформационная основа механизма свертывания проявится благодаря конформациям промежуточных состояний,

обнаруживаемых через дисульфидные связи, конечно, при условии, что они останутся неизменными при такой процедуре [63–66].

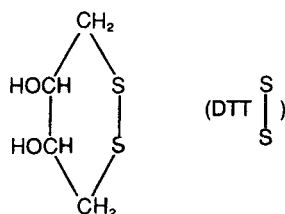
Способ контролируемого образования S–S-связи, основанный на реакции тиол-дисульфидного обмена, был предложен в 1970 г. В. Саксенон и Д. Уетлауфером [67]. Он связан с использованием дисульфидного реагента R_2SSR_2 в щелочных условиях, когда тиольная группа находится в ионной форме (R_1S^-) и чрезвычайно реакционноспособна:



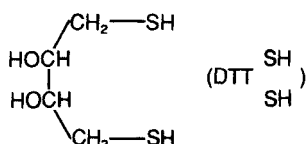
Образование по такому механизму дисульфидной связи между боковыми цепями остатков Cys в белке происходит в две стадии по следующей схеме:



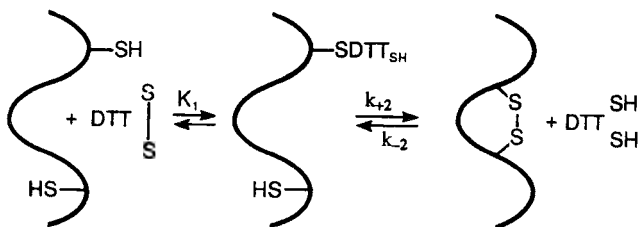
где k – константы скорости прямой (+) и обратной (–) реакций. Первая стадия реакции – обычная реакция тиол-дисульфидного обмена, лишенная какой-либо белковой специфики. Вторая же стадия целиком зависит от сближенности соответствующих остатков Cys, т.е. от конформационных возможностей белковой цепи. Кинетика суммарной реакции зависит от относительных скоростей реакций обеих стадий. При благоприятном взаимном расположении остатков Cys или в случае более быстрого их сближения по сравнению с образованием промежуточного продукта скорость синтеза дисульфидной связи ограничивается первой стадией и будет пропорциональна концентрации вводимого дисульфидного реагента. При его большой концентрации и накоплении промежуточного продукта скорость суммарной реакции лимитируется второй стадией. В случае медленного взаимодействия остатков Cys возникает конкурентная реакция с образованием ненужного продукта. Этого можно избежать, если использовать, по предложению У. Келланда, нелинейный дисульфид, а циклический, например дитиотреитол (DTT) [68]:



В восстановленной форме дитиотреитол имеет линейную структуру:

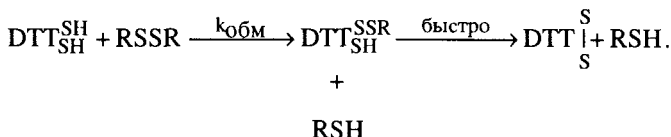


Его взаимодействия с белковой цепью описываются следующей схемой:



где K_1 – константа равновесия смешанного дисульфида равна, согласно Келланду, 10^{-4} моль $^{-1}$. Такое значение K_1 при обычных концентрациях $DTT \begin{array}{c} \text{S} \\ | \\ \text{S} \end{array}$ исключает заметное накопление этого продукта.

Скорость реакции межмолекулярного тиол-дисульфидного обмена, не отягощенного стерическими условиями, может быть оценена по скорости восстановления дисульфидов дитиотреитолом в форме $DTT_{\text{SH}}^{\text{SH}}$:

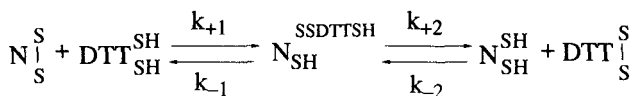


Скорость реакции здесь лимитируется первой стадией. Реакция будет необратима, если не добавлять в раствор RSH. Сульфгидрильные группы $DTT_{\text{SH}}^{\text{SH}}$ имеют различные значения рК (8,3 и 9,5), поэтому при промежуточном значении рН раствора в ионной форме может находиться только одна группа. Значение константы реакции зависит от химической природы заместителей в дисульфиде RSSR; его реакционная способность тем выше, чем электроположительнее R, что естественно, поскольку тиольная группа активна в своей анионной форме. Природа заместителя R отражается аналогичным образом и в

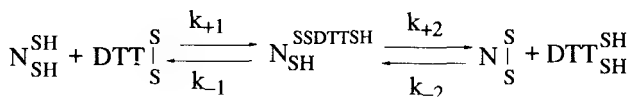
способности к ионизации меркаптановой группы RSH. Чем больше парциальный положительный заряд R, тем меньше pK_{RSH} и больше скорость обмена $k_{обм}$.

Т. Крейтон установил линейную зависимость между логарифмом константы скорости второго порядка ($\ln K$) и значением pK_{RSH} , наклон которой, а следовательно, и активность S-S-связи и тиольной группы зависят от окружения [69]. Как и следовало ожидать, при использовании в качестве денатуранта сильного электролита – гуанидингидрохлорида (6 М раствор) – связь между $\ln K$ и pK_{RSH} ослабляется (прямая близка к параллельной оси абсцисс), а неэлектролита – мочевины (8 М раствор) – влияние почти не обнаруживается (прямая находится под углом 45° к оси абсцисс).

Теперь на основе высказанных общих соображений рассмотрим конкретный пример разрушения и образования S-S-мостика между остатками Cys-14 и Cys-38 в нативной конформации БПТИ, воспользовавшись для иллюстрации количественными данными Крейтона [59]. Константа скорости реакции восстановления второго порядка нативного белка ($N \begin{smallmatrix} S \\ S \end{smallmatrix}$) с помощью $DTT \begin{smallmatrix} S \\ SH \end{smallmatrix}$



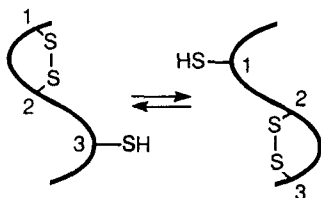
оказалась равной $38 \text{ с}^{-1} \cdot \text{моль}^{-1}$, а кажущееся значение pK тиольных групп в N_{SH}^{SH} – 8,8. Зная pK_{RSH} и ее зависимость от $\ln K$, найдем константу скорости k_{+1} , значение которой ($28 \text{ с}^{-1} \cdot \text{моль}^{-1}$) оказывается практически совпадающим с константами скоростей модельных соединений. Скорость образования дисульфидной связи Cys-14–Cys-38 с использованием $DTT \begin{smallmatrix} S \\ S \end{smallmatrix}$ пропорциональна концентрации реагента; при этом константа скорости реакции второго порядка равна $9,5 \text{ с}^{-1} \cdot \text{моль}^{-1}$.



При константе равновесия $K_1 = 10^{-4} \cdot \text{моль}^{-1}$ – скорость внутримолекулярного перехода, k_{+2} должна быть приблизительно 10^5 с^{-1} , а соответствующий период полураспада $\tau_{1/2} \sim 10^{-6} \text{ с}$ (значением k_{+2} определяется из условия $v_{+1} = v_{-1} + v_{+2}$, а k_{-1} – из формулы $K_1 = k_{+1}/k_{-1}$; малым значением k_{-2} пренебрегают). Относительная стабильность дисульфидных связей в $N \begin{smallmatrix} S \\ S \end{smallmatrix}$ и $DTT \begin{smallmatrix} S \\ S \end{smallmatrix}$ находится из соотношения скоростей прямой и обратной реакции: $k = 9,5/38,0 = 0,25$.

Таким образом, связь S-S в DTT^S в четыре раза стабильнее связи Cys-14-Cys-38 в нативной конформации молекулы БПТИ.

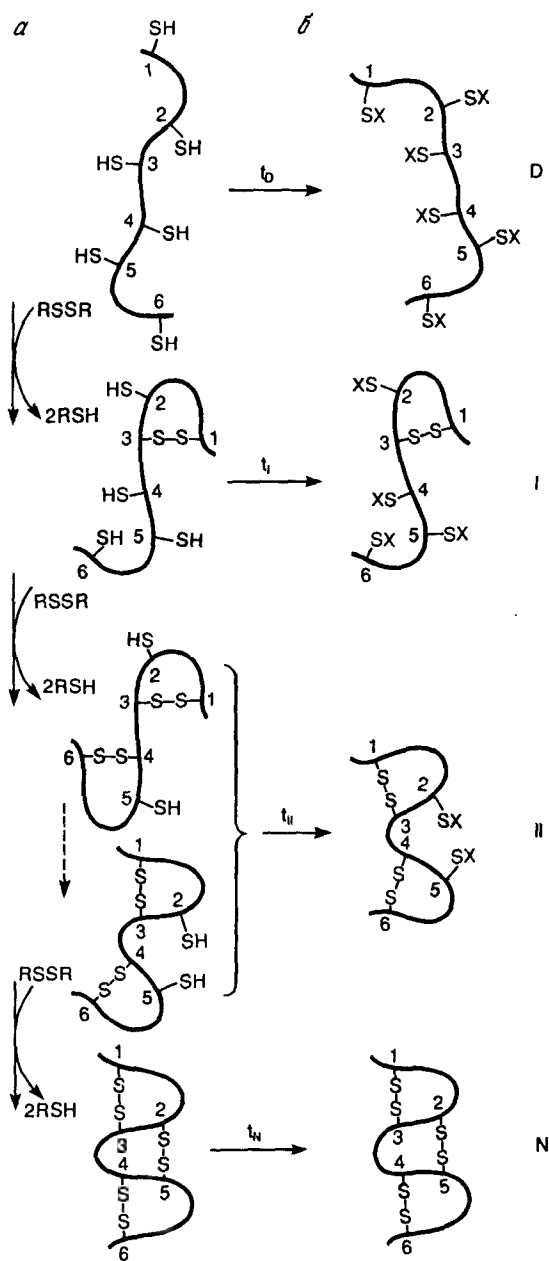
При свертывании и разворачивании белка может иметь место внутримолекулярная реакция тиол-дисульфидного обмена, сопровождающаяся соответствующим конформационным переходом:



Наиболее стабильная геометрия дисульфидной связи отвечает двухгранному углу C-S-S-C (χ^{S-S}), равному $\pm 90^\circ$. Все три S-S-связи в нативной конформации БПТИ имеют χ^{S-S} , близкий к оптимальному: -89° (Cys-5-Cys-55), -102° (Cys-14-Cys-38) и -88° (Cys-30-Cys-51). Барьер вращения вокруг S-S-связи составляет около 7,0 ккал/моль (Дж. Лове [70]; Р. Фразер и соавт. [71]; Н. Аллинжер и соавт. [72]), что значительно ниже барьера на пути разворачивания белковой цепи. Поэтому конформационные превращения, связанные с изменением геометрии дисульфидной группировки при денатурации белка, происходят сравнительно легко. При восстановлении и реокислении связей S-S с использованием реакции тиол-дисульфидного обмена можно манипулировать скоростями превращений в любых направлениях, меняя концентрацию тиольной и дисульфидной форм реагента. Это имеет решающее значение не только при изучении кинетики процесса денатурации, но и для контроля энергии дисульфидных взаимодействий, что достигается путем изменения энергетического баланса между свернутой и развернутой формами белка. Кроме того, подбирая химическую структуру дисульфидного реагента под условия эксперимента, можно влиять на скорость дисульфидных взаимодействий вплоть до их прекращения у тех или иных промежуточных состояний.

12.2. ФИКСАЦИЯ, БЛОКИРОВКА И РАЗДЕЛЕНИЕ ПРОМЕЖУТОЧНЫХ СОСТОЯНИЙ

Тиол-дисульфидная реакция обмена, благодаря которой образуются, разрушаются и обмениваются остатками Cys дисульфидные связи, может быть быстро прекращена добавлением реагента, взаимодействующего со свободными сульфгидрильными группами и тем самым блокирующего их. Чаще всего такими реагентами являются йодацетат и йодацетамид, реакция которых с тиолами проста и необратима. Согласно Крейтону [73], при pH 8,7 она протекает с константой скорости второго порядка от 2 до 5 с⁻¹ · моль⁻¹, так что при добавлении

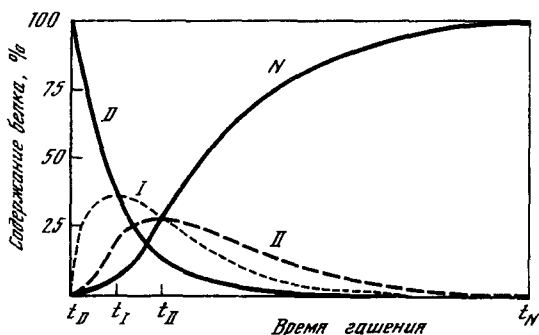


Р и с. III.5. Схема экспериментального подхода к исследованию структуры промежуточных состояний процесса свертывания белка с использованием дисульфидных связей

a — гипотетический путь свертывания полипептидной цепи с шестью остатками цистеина; *б* — фиксированные промежуточные состояния; t_D , t_I , t_{II} , t_N — времена блокирования тиолдисульфидного обмена соответственно у денатурированного белка (D), промежуточных продуктов с одной (I) и двумя (II) дисульфидными связями и у нативного белка (N) [73]

Рис. III.6. Кинетика гипотетического процесса свертывания белка с шестью остатками цистеина

Обозначения см. рис. III.5. [73]



в раствор одного из этих реагентов с концентрацией 0,1 М реакция тиол-дисульфидного обмена полностью гасится за несколько секунд. S-S-связи, существовавшие до момента гашения, стабилизируются в отсутствие необходимого донора электронов, не обмениваются остатками Cys и не разрушаются. Таким образом, практически моментально по сравнению со скоростью медленной ренатурации (десяtkи минут) остаются все процессы, связанные с взаимодействием боковых цепей остатков цистеина, фиксируются образовавшиеся до гашения дисульфидные связи и создаются идеальные условия для выделения и изучения содержащих эти связи промежуточных продуктов свертывания белковой цепи из полностью денатурированного состояния в нативную конформацию.

На рис. III.5 представлены основные этапы предполагаемого пути свертывания белковой цепи, содержащей шесть остатков Cys и имеющей в окончательной глобулярной структуре три дисульфидных мостика. На рис. III.6 приведены кинетические кривые денатурированного и нативного состояния белка и двух промежуточных метастабильных состояний с одной и двумя дисульфидными связями. Эти кривые, также гипотетические, иллюстрируют кинетику изображенного на рис. III.5 механизма укладки белковой цепи с точки зрения S-S-связей. При гашении реакции тиол-дисульфидного обмена к моменту времени t_D все молекулы белка будут стабилизированы в развернутой форме. К моменту t_I наибольшее количество молекул будет содержать одну дисульфидную связь, а к t_{II} — две. Следовательно, времена t_I и t_{II} — наиболее подходящие для прекращения взаимодействий остатков Cys и выделения накопившихся промежуточных продуктов I и II. Конформационный переход между двумя формами состояния II (на рис. III.5 указан пунктирной стрелкой) совершается столь быстро, что не влияет на другие процессы.

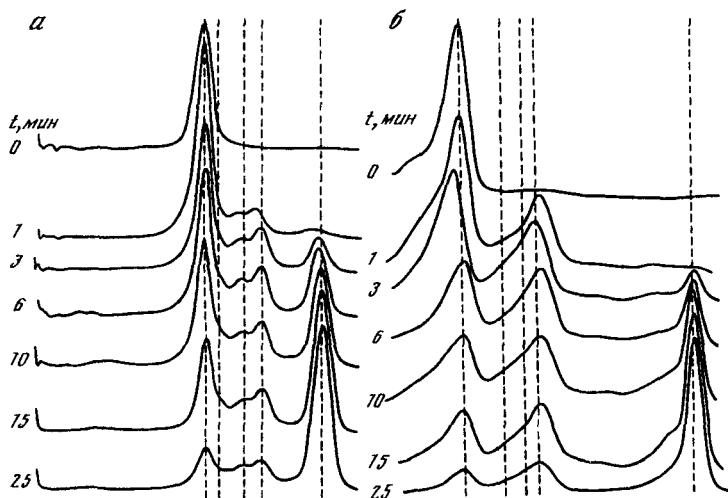
Возможность фиксировать и укладывать на разных этапах процесса свертывания белковой цепи промежуточные состояния с устойчивыми дисульфидными связями делает реальным их выделение, очистку и всестороннее исследование структурных, термодинамических и кинетических характеристик. Промежуточные продукты отличаются друг от друга формой и молекулярным объемом хотя бы в силу разного числа

дисульфидных связей, а также гетерогенностью, вносимой реагентом X, реакцией гашения (блокировки).

Различие в конформационных свойствах и зарядах дает возможность эффективнее использовать для разделения фиксированных продуктов гель-электрофорез, в особенности при малых значениях pH, когда становятся стабильными обусловленные кислотой промежуточные продукты. Молекулы БПТИ с полностью и частично восстановленными остатками Cys (состояния D, I и II), блокированные йодацетатом, мигрируют к катоду медленнее по сравнению с молекулами в тех же состояниях, блокированными йодацетамидом или кислотой, из-за соответственно шести, четырех и двух отрицательно заряженных ацетатных групп. В свою очередь, молекулы в состояниях D, I и II с нейтральными блок-группами ацетамида и кислоты имеют тот же заряд, что и молекула белка в нативном состоянии. Более медленная скорость их перемещения к катоду по сравнению с N обусловлена большей рыхлостью форм. Таким образом, скорость миграции белка, фиксированного йодацетатом, определяется как зарядом, так и формой, а белка, фиксированного йодацетамидом или кислотой, – только формой. Если предположить одинаковое конформационное влияние блокирующих реагентов йодацетата и йодацетамида, то форма белка будет коррелировать только с числом дисульфидных связей, которые при этом условии можно определить сравнением скоростей миграций одного и того же продукта, фиксированного как йодацетатом, так и йодацетамидом, со скоростью миграции белка в состояниях D или N. Измеряя денситометром плотность в геле и наблюдая за ее изменением во времени, можно составить представление о кинетике свертывания белковой цепи.

На рис. III.7 приведены денситометрические кривые электрофоретического разделения молекул БПТИ, блокированных йодацетамидом (а) и йодацетатом (б) в процессе медленной ренатурации. Сначала весь блок находился в состоянии D, которому отвечает в обоих случаях единственный резкий максимум плотности. При ренатурации и гашении реакции тиол-дисульфидного обмена через 1, 3, ..., 25 мин интенсивность полосы D постепенно уменьшается, а полосы N – увеличивается. На первой минуте ренатурации возникают и в течение 10–15 мин устанавливаются пики плотности промежуточных продуктов А, В и С. Близкое расположение пиков промежуточных продуктов друг к другу и к пику D свидетельствует, что они отвечают белковым молекулам, имеющим одну дисульфидную связь и отличающимся друг от друга формой.

Этим же методом Крейтон [74] при иных кинетических условиях ренатурации получил промежуточные продукты с двумя дисульфидными связями. Самого лучшего разделения промежуточных состояний белковой цепи он достиг с помощью ионообменной хроматографии, используя блокировку йодацетатом. Разрешающая способность метода позволила одновременно наблюдать за кинетикой продуктов с одной и двумя дисульфидными связями. Всего между пиками состояний D и N Крейтон обнаружил восемь пиков метастабильных состояний белковой



Р и с. 13.7. Денситометрические кривые электрофоретического разделения молекул, фиксированных йодацетамидом (а) и йодацетатом (б) в процессе ренатурации восстановленного белка БПТИ [59]

цепи БПТИ. Ионообменная хроматография была использована для выделения промежуточных продуктов и их разделения по числу дисульфидных связей. Идентификация самих же связей в последовательности БПТИ производилась после протеолитического расщепления белка на фрагменты методом диагонального электрофореза.

12.3. КИНЕТИЧЕСКИЙ ПУТЬ РЕНАТУРАЦИИ ПАНКРЕАТИЧЕСКОГО ТРИПСИНОВОГО ИНГИБИТОРА

После обнаружения целой гаммы промежуточных состояний на пути от полностью денатурированного белка к нативному Крейтон детально изучил кинетику изменений и взаимопревращений этих состояний в ходе свертывания и разворачивания белковой цепи. Далее он выяснил оптимальные условия моментальной остановки процесса ренатурации БПТИ и гашения тиол-дисульфидной реакции обмена, а затем разработал способы фиксации и выделения промежуточных состояний, определения у них количества дисульфидных связей и мест их локализации в аминокислотной последовательности БПТИ. Таким образом, последующее изучение денатурации белка, а именно получение количественных данных о кинетике и термодинамике всех этапов процесса и доказательное описание механизма самоорганизации пространственной структуры белка *in vitro*, имеет серьезную основу, созданную Крейтоном в результате огромной целенаправленной подготовительной работы.

Для выяснения пути перехода промежуточных продуктов друг в

друга путем образования, разрушения и перераспределения дисульфидных связей были использованы два линейных дисульфидных реагента (гидроксиэтилдисульфид и окисленный глутатион) и один циклический реагент (дитиотреитол). Предварительно было выяснено, что разрушение трех дисульфидных связей БПТИ приводит к состоянию, в котором нативно подобные структурные элементы практически не обнаруживаются [75, 76]. Процесс ренатурации полностью восстановленной молекулы БПТИ (D) начинается с образования начальной дисульфидной связи с линейными дисульфидными реагентами. Это происходит быстро и в строгом соответствии с реакцией второго порядка, что указывает на большую скорость внутримолекулярных переходов ($k_{+2} > 1 \text{ с}^{-1}$).

В образовании первой S-S-связи принимают участие все шесть остатков Cys, активность которых практически одинакова и близка к активности простых модельных тиолов. Из 15 возможных промежуточных состояний с одной дисульфидной связью накапливаются только два независимо от времени ренатурации, природы и концентрации дисульфидных реагентов. Один продукт с S-S-связью (30–51) неизменно составляет 60–70%, а другой – (5–30) – 20–30%; в минорную часть (менее 10%) входят продукты (5–51) и (30–55). Избирательность в накоплении монодисульфидных производных при первоначально эквивалентном состоянии всех остатков Cys и генерации беспорядочного набора моно-S-продуктов полностью денатурированным белком указывает на высокие скорости перераспределения взаимодействующих остатков Cys посредством тиол-дисульфидной реакции обмена. Нестатистичность обменов, т.е. наличие определенной направленности, обусловлена, по-видимому, меняющимися конформационными свойствами свертываемой полипептидной цепи. Переход беспорядочного спектра моно-S-S-продуктов, генерируемого гуанидингидрохлоридом, в упорядоченный совершается при доведении pH раствора до нормального значения ($\sim 0,7$) за несколько секунд.

Т. Крейтон показал, что после обработки денатурантом все 15 монодисульфидных продуктов присутствуют в растворе в равных концентрациях и, следовательно, изоэнергетичны. Улавливание их осуществляется переводом тиольных групп в неактивную, незаряженную, форму подкислением среды. После удаления денатуранта при сохранении низкого значения pH связи S-S не остаются равными. При повышении pH и переводе SH-групп в активную форму наступают избирательное перераспределение дисульфидных связей и накопление в растворе в основном только продуктов (30–51) и (5–30). Исключение составляет производное (5–55), которое не меняет своей позиции и не конвертирует в нормальные моно-S-продукты (30–51 и 5–30). Оно не образуется в нормальных условиях ренатурации и обнаруживается лишь с введением денатурирующего агента. Факт участия всех шести остатков Cys в образовании двух основных моно-S-S-продуктов был подтвержден Крейтоном при наблюдении закономерного падения скорости увеличения их концентрации при последовательной необратимой блокировке остатков 14–38 и 5–55 белка в состоянии D.

Скорость восстановления связи S-S нормальных моно-S-S-продуктов с помощью DTT_{SH}^{SH} равна $38 \text{ с}^{-1} \cdot \text{моль}^{-1}$, что совпадает с величиной, ожидаемой для модельного дисульфида.

Предпочтительная аккумуляция наиболее стабильного промежуточного состояния (30-51) имеет важные термодинамические и кинетические последствия, поскольку именно с этого состояния начинается путь продуктивного свертывания белковой цепи, и все последующие состояния содержат дисульфидную связь 30-51. В нативной конформации БПТИ остаток Cys-30 находится в самом начале β -складчатого листа (со стороны β -изгиба), а Cys-51 принадлежит α -спирали. Таким образом, S-S-связь образует мостик между двумя элементами вторичной структуры.

Наличие α -спирали и β -структуры в моно-S-S-продукте (30-51) было обнаружено с помощью спектров УФ, КД [64, 77] и ЯМР [65]. Не менее убедительные аргументы в пользу зарождения в самом начале процесса ренатурации вторичных структур получены также Т. Оасом и П. Кимом [78], обнаружившим их элементы в структуре соединенных дисульфидной связью двух пептидов из 16 и 14 остатков, последовательности которых воспроизводят порядки аминокислот БПТИ вблизи Cys-30 и Cys-51. Т. Крейтон [18] полагает, что конформация моно-S-S-продукта (30-51), возникающая на ранней стадии процесса ренатурации и определяющая его последующий ход, стабилизируется за счет взаимодействий между двумя вторичными структурами, составляющими большую часть белка. Конформация, присутствующая в промежуточном продукте (30-51), не является доминирующей в индивидуальных модельных пептидах из 16 и 14 остатков в отсутствие S-S-связи [78]. Количество ее в полностью восстановленном белке оценивается около 0,1% [75]. Следовательно, утверждает Крейтон, значительная предпочтительность моно-S-S-продукта (30-51) относительно других промежуточных состояний объясняется не предсуществованием регулярных структур, а взаимной стабилизацией посредством дисульфидной связи. При дальнейшей сборке белковой цепи БПТИ и переходе монодисульфидных продуктов в дидисульфидные все промежуточные метастабильные продукты содержат, как отмечалось, связь S-S между остатками Cys-30 и Cys-51, и поэтому образование новой S-S-связи происходит через самый предпочтительный моно-S-S-продукт (30-51). Скорость процесса, в котором принимают участие остатки Cys-5, Cys-14 и Cys-38, пропорциональна концентрации дисульфидного реагента. В результате образуются продукты (30-51, 5-14), (30-51, 5-38) и (30-51, 14-38), причем последний содержит дисульфидные связи нативной конформации белка и более предпочтителен первым двум в отношении кинетики взаимодействия с DTT_{SH}^S . Связь Cys-5-Cys-55, которая также имеется в полностью собранной структуре БПТИ, не образуется. Разумное объяснение этому факту не найдено [18]. Причина, как полагает Крейтон, заключается в том, что при наличии в растворе дисульфида RS-SR

остаток Cys-55 реагирует более эффективно не с каким-либо из свободных остатков Cys собственного белка, а с линейным дисульфидом, образуя быстро накапливающееся производное со смешанной дисульфидной связью (30-51, 55-SR) [59].

Относительные скорости внутримолекулярной конверсии ди-S-S-продуктов (30-51, 5-14), (30-51, 5-38) и (30-51, 14-38) точно неизвестны. Однако можно полагать, что соединение (30-51, 14-38) переходит в два других заметно быстрее, чем обратно. Это уже третий факт, который на первый взгляд как будто бы противоречит кинетике самого быстрого прямого механизма свертывания белковой цепи. При исследовании первого этапа ренатурации были выяснены невозможность образования моно-S-S-производного с правильной дисульфидной связью Cys-5-Cys-55 и ее трансформации в другие дисульфидные связи. Рассмотрение второго этапа также показало отсутствие этой связи в ди-S-S-производных. Неожиданно обнаруживается, что почти готовый продукт с двумя правильными связями из трех оказывается наименее стабильным по сравнению с двумя другими ди-S-S-продуктами, имеющими только одну дисульфидную связь нативного белка (30-51).

Взаимная конверсия ди-S-S-продуктов (30-51, 5-14) и (30-51, 5-38) происходит очень быстро или вообще не происходит. Исследование этого вопроса усложнено быстрой конверсией обоих соединений в ди-S-S-промежуточное состояние (30-51, 5-55), включающее только нативные дисульфидные связи. Производные с двумя связями S-S восстанавливаются до моно-S-S-продуктов (при участии $\text{DTT}_{\text{SH}}^{\text{SH}}$) со скоростью около $300 \text{ c}^{-1} \cdot \text{моль}^{-1}$, т.е. на порядок больше скорости восстановления связи в модельных дисульфидах, что Крейтон объясняет наличием небольшого конформационного напряжения белковой цепи. Наиболее перспективным из метастабильных состояний с двумя дисульфидными связями, приближающими ренатурацию БПТИ к завершению, оказалось, таким образом, состояние (30-51, 5-55). Оно образуется не прямым путем, а благодаря внутримолекулярным перегруппировкам ди-S-S-производных (30-51, 5-14), (30-51, 5-38) и (30-51, 14-38) со скоростью около $0,4 \text{ c}^{-1} \cdot \text{моль}^{-1}$, не зависящей от концентрации тиольного и дисульфидного реагентов. Продукт (30-51, 5-55) – это почти сформировавшаяся нативная трехмерная структура белка, в которой отсутствует лишь одна дисульфидная связь Cys-14-Cys-38 ($\text{N}_{\text{SH}}^{\text{SH}}$). О сходстве пространственной структуры $\text{N}_{\text{SH}}^{\text{SH}}$ нативной конформации $\text{N} \begin{smallmatrix} \text{S} \\ | \\ \text{S} \end{smallmatrix}$ свидетельствует легкость образования недостающей связи S-S, объясняющаяся сближенностью остатков Cys-14 и Cys-38 (для превращения $\text{N}_{\text{SH}}^{\text{SH}}$ в $\text{N} \begin{smallmatrix} \text{S} \\ | \\ \text{S} \end{smallmatrix}$ требуется всего 10 мкс).

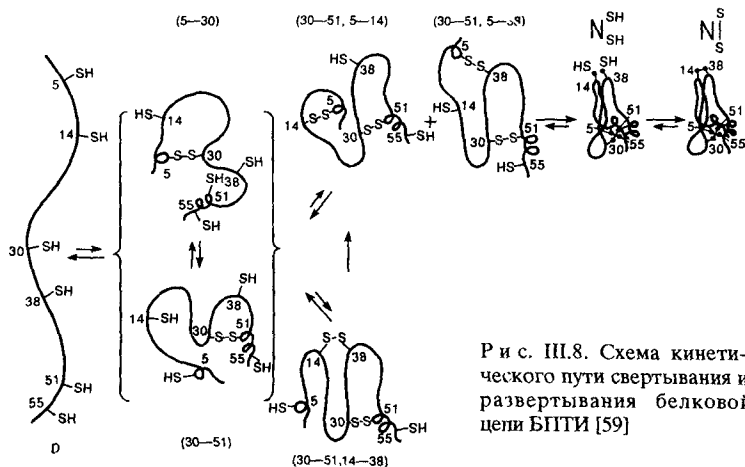
Полная схема кинетического пути обратимой денатурации белковой цепи БПТИ, полученная в результате детальных исследований Крейтона, представлена на рис. III.8. Последовательность событий между двумя предельными термодинамически стабильными состояниями бел-

ковой молекулы (от D к N), описанными через дисульфидсодержащие метастабильные промежуточные состояния, изложена выше. Обратный процесс (от N к D) может быть инициирован добавлением дитиотреитола в восстановленной форме ($\text{DTT}_{\text{SH}}^{\text{SH}}$). Он начинается с разрыва дисульфидной связи Cys-14–Cys-38. Образовавшийся первый метастабильный продукт $\text{N}_{\text{SH}}^{\text{SH}}$ медленно, с периодом полураспада около 10 ч, и независимо от концентрации $\text{DTT}_{\text{SH}}^{\text{SH}}$ переходит в ди-S–S-производные (30–51, 5–14) и (30–51, 5–38), которые трансформируются в монодисульфидные продукты, на первых порах преимущественно содержащие (30–51) и (5–30). Процесс денатурации идет с неизменным накоплением только состояния D. Таким образом, схема разворачивания белковой цепи является, по существу, зеркальным отражением схемы свертывания цепи. Подбирая концентрации восстановленной и окисленной форм дитиотреитола, можно направлять процесс в ту или иную сторону и достигать или полностью развернутого состояния белковой цепи (D), или нативной конформации белка ($\text{N}_{\text{S}}^{\text{S}}$). Константа равновесия, пропорциональная отношению содержанию двух форм DTT в третьей степени:

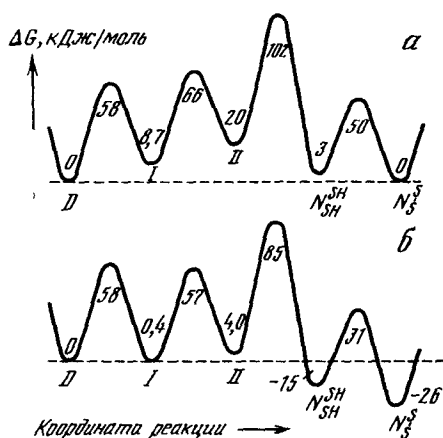
$$K = \frac{\left[\text{N}_{\text{S}}^{\text{S}} \right]}{[D]} \left(\frac{\text{DTT}_{\text{SH}}^{\text{SH}}}{\text{DTT}_{\text{S}}^{\text{S}}} \right)^3.$$

может быть найдена экспериментально по легко измеряемым концентрациям $\text{N}_{\text{S}}^{\text{S}}$ и [D]. С другой стороны, эту же константу можно получить, учитывая все промежуточные состояния в ходе денатурации или ренатурации и соответствующие константы скоростей конформационных переходов и реакций тиол-дисульфидного обмена с помощью дитиотреитола. Совпадение константы равновесия, рассчитанной Крейтоном, исходя из определенного механизма свертывания и разворачивания белковой цепи, с величиной, найденной им непосредственно из эксперимента, свидетельствует в пользу результирующей кинетической схемы (рис. III.8), учитывающей правильно все этапы процесса и взаимоотношения между всеми промежуточными состояниями.

Равное содержание в растворе двух предельных структур белка, $\text{N}_{\text{S}}^{\text{S}}$ и D, получено при отношении $\text{DTT}/\text{DTT}_{\text{S}}^{\text{S}}$, равном 1/26. Следовательно, средняя стабильность трех дисульфидных связей в нативной конформации БПТИ составляет 0,04 стабильности $\text{DTT}_{\text{S}}^{\text{S}}$.



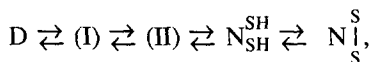
Р и с. III.8. Схема кинетического пути свертывания и разворачивания белковой цепи БПТИ [59]



Р и с. III.9. Изменение свободной энергии внутримолекулярных переходов в процессе свертывания и разворачивания белковой цепи БПТИ (приведены относительные значения свободной энергии исходного (D), промежуточных (I, II, N_{SH}^{SH}) и конечного (N_1^S) состояний)

Диаграмма (а) получена при использовании набора констант скоростей при отношении $DTT_1^S / DTT_{SH}^{SH} = 26/1$, а диаграмма (б) — $10^3/1$ [59]

Кинетический путь укладки и развертки полипептидной цепи БПТИ в общем виде записывается, согласно Крейтону, следующей формулой:



где (I) и (II) – соответственно моно- и ди-S-S-промежуточные продукты. Для такого пути получен внутренние согласованный набор констант скоростей, в частности констант образования S-S-связей (k_{+2}), величины которых характеризуют относительную стабильность соответствующих продуктов. По этим данным, используя уравнение

$$\Delta G = -RT \ln \frac{hk_r}{KT},$$

где R – универсальная газовая постоянная; T – температура (в

где R – универсальная газовая постоянная; T – температура (в абсолютной шкале); h – постоянная Планка; k – постоянная Больцмана; k_r – константа скорости реакции, можно рассчитать относительную свободную энергию Гиббса и, таким образом, воспроизвести энергетический профиль свертывания и разворачивания белковой цепи БПТИ (рис. III.9). Это было сделано Крейтоном для двух вариантов набора констант скоростей, один из которых получен при условии $DTT_S^S/DTT_{SH}^{SH} = 26$, когда состояния D и N_S^S изоэнергетичны (рис. III, 9,

а), а другой – при условии $DTT_S^S/DTT_{SH}^{SH} = 10^3$, когда N_S^S стабильнее D на 6,2 ккал/моль (рис. III, 9, б). Последняя величина близка энергии стабилизации нативной конформации БПТИ, утрачиваемой в растворе с 8 М концентрацией мочевины.

Энергетический профиль ренатурации БПТИ (рис. III, 9, б) свидетельствует, во-первых, о кооперативности процесса, поскольку все промежуточные состояния с одной или двумя дисульфидными связями термодинамически нестабильны относительно D и N_S^S , и, во-вторых, о сравнительно свободном кинетическом пути свертывания белковой цепи и, следовательно, большой вероятности нахождения состояния N_S^S в глобальном минимуме. Из последнего можно заключить о согласованности между термодинамикой и кинетикой процесса ренатурации.

Установлением пути свертывания полипептидной цепи БПТИ еще не заканчивается изучение механизма обратимой денатурации белка. Исследования Крейтона во многом помогли ответить на вопрос о том, как осуществляется процесс спонтанной структурной самоорганизации белка в условиях *in vitro*. Так детально и аргументировано это было сделано впервые. Следующая задача заключается в том, чтобы понять полученные данные, т.е. ответить на вопрос, почему процесс сборки нативной конформации белка осуществляется именно таким, а не иным образом, в чем заключается физика явления обратимой денатурации, каково взаимоотношение процессов *in vitro* и *in vivo*. Т. Крейтон уделяет внимание этому вопросу, однако его анализ имеет чисто описательный, феноменологический характер и качественно отличается от экспериментальной части его исследования.

12.4. РЕНАТУРАЦИЯ РИБОНУКЛЕАЗЫ

Наиболее интересно сопоставление результатов денатурации БПТИ, выбранного в качестве тест-объекта, с данными денатурации бычьей панкреатической рибонуклеазы – классического объекта, изученного также детально. В отличие от БПТИ, здесь нет столь же полной информации о промежуточных продуктах и последовательности конформационных переходов от состояния D к N . Выше отмечалось,

что Анфинсеном была впервые показана спонтанность процесса ренатурации рибонуклеазы, завершающегося образованием четырех дисульфидных связей нативной конформации белка и полным восстановлением ферментативной активности. Позднее это было подтверждено рядом исследований.

При изучении свертывания рибонуклеазы большой интерес вызвал факт более быстрой реставрации дисульфидных связей по сравнению с восстановлением ферментативной активности белка. Он был обнаружен Анфинсеном и соавт. [79] в 1961 г. при окислении денатурированной рибонуклеазы кислородом воздуха и объяснен образованием неправильных S-S-связей, которые со временем перераспределяются в правильные, что и лимитирует скорость укладки нативной конформации. Этому объяснению, однако, противоречило более позднее наблюдение того же Анфинсена за скоростью восстановления активности белка, которая оказалась обратно пропорциональной его концентрации [80]. Тогда было предположено образование денатурированными цепями рибонуклеазы межмолекулярных дисульфидных связей, которые со временем разрываются и переходят в правильные внутримолекулярные связи. Очевидно, что чем больше концентрация денатурированного белка, тем вероятнее ассоциация их молекул посредством S-S-связей и медленнее восстановление активности. Процесс окисления восстановленной рибонуклеазы кислородом воздуха оказался, таким образом, отягощенным побочными явлениями, не имеющими прямого отношения к механизму молекулярной реоксидации.

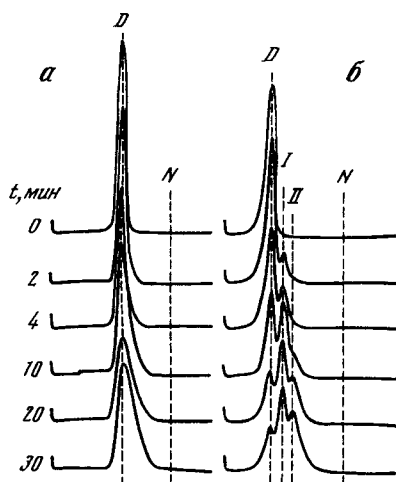
Г. Шерага и соавт. [81], Д. Уетлауфер и соавт. [82] отказались от реокисления рибонуклеазы кислородом воздуха и использовали для образования S-S-связей реакцию тиол-дисульфидного обмена с помощью глутатиона. В обеих работах отмечено быстрое появление промежуточных продуктов с тремя S-S-связями, после которого наступали продолжительный период переориентации взаимодействующих остатков Cys и рост ферментативной активации. Авторами была принята точка зрения Анфинсена и соавт. [79] относительно образования на первом этапе реоксидации большого числа промежуточных продуктов с неправильными дисульфидными связями.

Исследования Р. Болдвина и соавт. [56] и Т. Крейтона [83, 84] показали, что повторное свертывание рибонуклеазы с четырьмя правильными дисульфидными связями может происходить *in vitro* быстро, если придерживаться условий, близких к условиям укладки белковой цепи БПТИ. Для интерпретации промежуточных состояний и определения скорости образования S-S-связей ход процесса ренатурации рибонуклеазы, как и в случае БПТИ, блокировался на разных стадиях, выделялись промежуточные продукты и с помощью электрофоретической подвижности они анализировались. На начальном этапе сборки полипептидной цепи наблюдалась близкая аналогия в поведении рибонуклеазы и БПТИ. При введении $\text{DTT} \begin{smallmatrix} \text{S} \\ | \\ \text{S} \end{smallmatrix}$ моно-S-S-продукты первого и второго белка образовывались примерно с

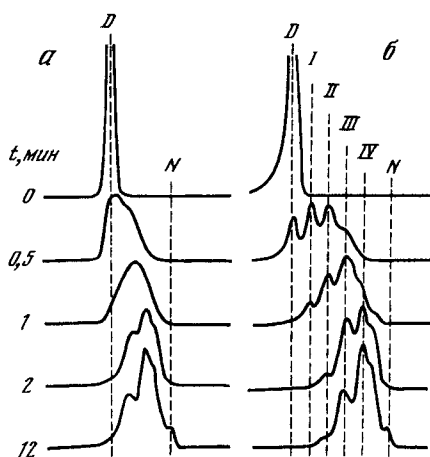
одинаковой скоростью. Далее, однако, картина менялась: ди-S-S-продукты появлялись медленнее, а продукты с тремя и четырьмя дисульфидными связями вообще не обнаруживались. Все это наглядно иллюстрируется рис. III.10, изображающим электрофоретическое разделение промежуточных продуктов рибонуклеазы, блокированных йодацетамидом (а) и йодацетатом (б). Полосы (I) и (II) на рис. III.10 отвечают состояниям с одной и двумя S-S-связями. При обсуждении аналогичных данных по БПТИ отмечалось, что электрофоретическая подвижность продуктов, фиксированных йодацетамидом, определяется лишь формой молекул. В связи с этим отсутствие разрешения полосы D на компоненты и наблюдающееся только ее расширение (рис. III.10, а) свидетельствуют о близости конформационных состояний рибонуклеазы с одной и двумя S-S-связями к состоянию D, т.е. к статистическому клубку. У молекул БПТИ, аминокислотная последовательность которой более чем в два раза короче последовательности рибонуклеазы, этого не происходит (рис. III.10, б); из рис. III.10 видно, что заметное различие в конформационных состояниях белковой цепи имеет место даже среди отдельных моно-S-S-продуктов.

Полученные Крейтоном результаты по ренатурации рибонуклеазы с реагентом $\text{DTT} \begin{smallmatrix} \text{S} \\ | \\ \text{S} \end{smallmatrix}$ свидетельствуют о том, что через 30 мин после запуска процесса в образующейся смеси накапливаются при частичном сохранении состояния D только моно- и ди-S-S-продукты; образование третьей дисульфидной связи в этих условиях не происходит [83, 85]. Следовательно, экспериментальные данные по реокислению БПТИ и рибонуклеазы не согласуются с распространенным представлением о таком пути свертывания белка, при котором образование одной правильной дисульфидной связи автоматически приводит к сближенности остатков цистеина, образующих между собой следующую и также правильную дисульфидную связь и т.д., вплоть до конформации $\text{N}_{\text{SH}}^{\text{SH}}$, близкой к нативной, в которой сближены последние свободные остатки Cys.

Более быстрое образование третьей и четвертой дисульфидных связей происходит при использовании в качестве дисульфидного реагента окисленного глутатиона (S-S-глутатиона). Однако, как видно из рис. III.11, и в этом случае ренатурация не достигает состояния N. Рибонуклеаза принимает полностью нативную конформацию после медленного внутримолекулярного перераспределения S-S-связей в три-S-S-продуктах (III) и последующего тиолкатализируемого перераспределения тетра-S-S-продуктов (IV). Полупериоды конформационных переходов, завершающихся образованием промежуточных продуктов с одной (I), двумя (II), тремя (III) и четырьмя (IV) дисульфидными связями, согласно Крейтону, равны $2 \cdot 10^{-3}$, $3 \cdot 10^{-3}$, 1 и 20 с соответственно [83–85]. Следовательно, образованные вначале у восстановленной рибонуклеазы дисульфидные связи не только не благоприятствуют образованию следующих, а, напротив, препятствуют этому. В процессе ренатурации БПТИ полупериоды накопления



Р и с. III.10. Денситометрические кривые электрофоретического разделения молекул, фиксированных йодацетамидом (а) и йодацетатом (б) в процессе ренатурации панкреатической рибонуклеазы с использованием в качестве дисульфидного реагента дитиотреитола [83]



Р и с. III.11. Денситометрические кривые электрофоретического разделения молекул, фиксированных йодацетамидом (а) и йодацетатом (б) в процессе ренатурации панкреатической рибонуклеазы с использованием в качестве дисульфидного реагента окислительного глутатиона (S—S-глутатион) [83]

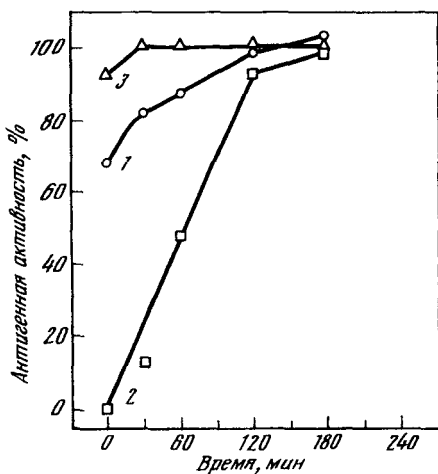
промежуточных продуктов (I) и (II) имеют тот же порядок, что и у рибонуклеазы, а продукты с тремя S—S-связями (III) — 12 мкс. Укладка белковой цепи БПТИ *in vitro*, если судить по метастабильным промежуточным состояниям с дисульфидными связями, менее беспорядочна, чем у рибонуклеазы, поскольку моно-S—S-продукты у этого белка более компактны, а скорость образования продуктов с двумя дисульфидными связями больше, чем с одной. Энергетические барьеры укладки БПТИ, по-видимому, также ниже, так как ее ди-S—S-продукты быстро переходят в конформацию N_{SH}^{SH} , близкую к нативной, а у рибонуклеазы время перегруппировки S—S-связей более продолжительно и, кроме того, сам процесс затрагивает продукты, имеющие насыщенные системы дисульфидных связей.

Р и с. III.12. Кинетика восстановления антигенной активности рибонуклеазы в процессе ренатурации

Использованы антитела, узнающие участки: 1 — (1—13), 2 (31—79), 3 (80—124) белковой глобулы [86]

Л. Чавец и Г. Шерага [86] предприняли попытку проследить за возникновением нативноподобной конформации рибонуклеазы в процессе ее реоксидации на воздухе, воспользовавшись иммунохимическими методами. Они получили набор антител, узнающих в трехмерной структуре белка фрагменты 1—13, 31—79 и 80—124, и с их помощью исследовали кинетику восстановления антигенной активности по ходу ренатурации рибонуклеазы. Результаты, представленные на рис. III.12, показывают неизменное увеличение активности со временем, последовательность и постоянную направленность сборки трех выбранных фрагментов в сторону нативной конформации рибонуклеазы. Л. Чавец и Г. Шерага пришли к заключению, не согласующемуся с данными Т. Крейтона по ренатурации рибонуклеазы и отчасти БПТИ, проведенной, правда, в иных условиях. На основе результатов иммунохимического анализа они представили механизм ренатурации белка, исключая образование промежуточных продуктов, прямо не приближающих свертывание полипептидной цепи к конечной физиологически активной трехмерной структуре. По их мнению, процесс ренатурации рибонуклеазы представляет собой строго упорядоченное, последовательное формирование структурных элементов нативной конформации белка.

С. Шаффер [87], исследуя процесс ренатурации рибонуклеазы с помощью S—S-глутатиона, обнаружил, что образование моно- и ди-S—S-продуктов практически не сказывается на кривых кругового дихроизма, при последующем появлении и накоплении продуктов с большим числом дисульфидных связей они приближаются к спектру нативного белка. В связи с тем, что в данном случае изменения в спектрах кругового дихроизма, как и в случае изменений поглощения и флуоресценции, отмеченных Р. Хантгеном и соавт. [81], происходили раньше восстановления ферментативной активности рибонуклеазы, то, как полагает Крейтон, они связаны главным образом с формированием у три- и тетра-S—S-производных вторичных структур и гидрофобного окружения у ароматических остатков, а не с завершением образования нативной конформации. С. Шаффер и соавт. [88] исследовали влияние среды на скорость свертывания белковой цепи рибонуклеазы с использованием окисленного и восстановленного глутатиона. Обнаружено, что действие нейтральных солей на скорость ренатурации



симбатно их стабилизирующему влиянию на свернутое состояние белка. Это позволило предположить, что в продуктивных промежуточных состояниях, последовательно переходящих по ходу ренатурации в нативную конформацию, реализуются преимущественно те же взаимодействия, что и в конечной структуре.

Выводы Чавеца и Шераги [86], как и Шаффера [87, 88], не согласуются с результатами и более поздних исследований Крейтона и соавторов рибонуклеазы А [89, 90] и рибонуклеазы Т1 [91] методами, использованными при изучении БПТИ. Здесь также обнаруживаются промежуточные S-S-продукты, свидетельствующие о внутримолекулярной реорганизации дисульфидных связей по ходу ренатурации, такой же, как в случае трипсिनного ингибитора. Не является в связи с этим неожиданным существование ферментов – дисульфидных изомераз, способствующих свертыванию БПТИ и быстрому образованию правильной системы дисульфидных связей [92, 93] (подробнее см. гл. 14).

12.5. РЕНАТУРАЦИЯ ЛИЗОЦИМА

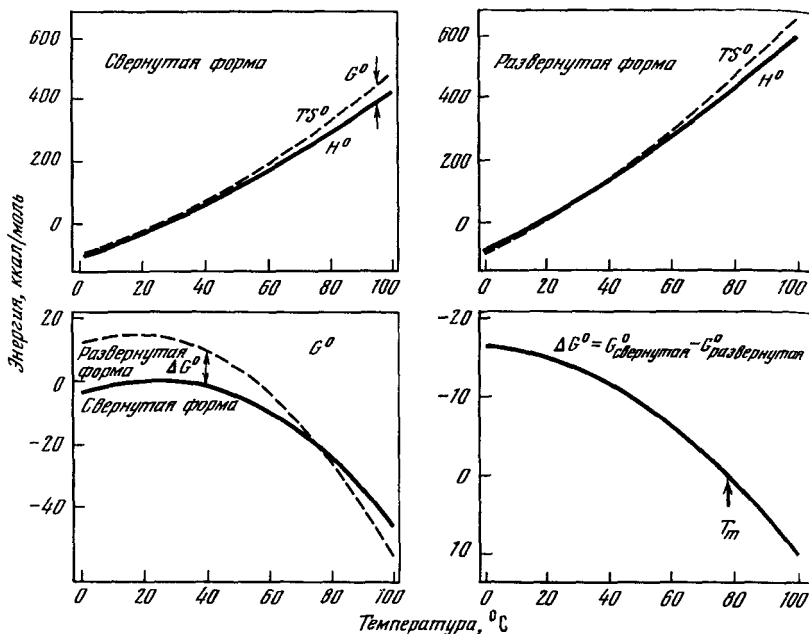
Много работ посвящено изучению ренатурации лизоцима, начавшемуся на современном уровне с исследования К. Эпштейна и Р. Голдбергера [94]. Однако и в них, как и в случае рибонуклеазы, нет достаточной информации для однозначного ответа на вопрос об основных, принципиальных моментах механизма свертывания белковой цепи. Р. Брэдшоу и соавт. [95], а позднее В. Саксена и Д. Уетлауфер [67] использовали для изучения обратимой денатурации лизоцима реакцию тиол-дисульфидного обмена; последние стали проводить ее с S-S-глутатионом. В. Саксена и Д. Уетлауфер нашли, что сборка нативной конформации белка требует значительного количества восстановленного глутатиона, что является признаком образования промежуточных продуктов с неправильными, разрушаемыми на последующих стадиях ренатурации дисульфидными связями. Полупериод регенерации активного фермента составил при оптимальных условиях около 5 мин. С. Ристоу и Д. Уетлауфер проанализировали смесь продуктов ранней стадии реоксидации лизоцима кислородом воздуха в присутствии ионов Cu^{2+} [96]. Они обнаружили несколько продуктов метастабильных состояний с S-S-связями из 36 возможных в принципе и пришли к заключению о наличии немногочисленных путей свертывания белковой цепи.

У. Андерсон и Д. Уетлауфер проследили развитие процесса ренатурации лизоцима с помощью восстановленного и окисленного глутатиона [97]. Скорость образования дисульфидных связей, по их данным, опережает, точно так же, как у рибонуклеазы, восстановление ферментативной активности. Тем не менее авторы предположили прямой путь реставрации нативной конформации лизоцима только через продуктивные метастабильные состояния, не требующие переориентации дисульфидных связей. Однако выводы авторов о механизме сборки лизоцима нельзя считать достаточно обоснованными. В работе не были локализованы дисульфидные связи в продуктах, образованных

на разных стадиях процесса, не была исключена возможность создания межцепочечных S-S-связей и не приведены доказательства отсутствия таковых. Кроме того, нет уверенности в идентичности промежуточных продуктов, полученных в результате тиол-дисульфидного обмена и фиксированных блокировкой тиольных групп белковой цепи N-этилmaleимидом, так как до блокировки добавлялась мочеви́на (4 М), направляющая, как известно, процесс в обратную сторону с вероятным перераспределением связей S-S.

А. Ачариа и Г. Таниучи [98] исследовали катализируемое ионами Cu^{2+} окисление на воздухе восстановленного лизоцима с использованием гель-фильтрации для разделения промежуточных продуктов, находящихся на разных этапах сборки нативной конформации. Наибольшее внимание было уделено состояниям ранней стадии ренатурации. При этом, однако, были использованы заниженные концентрации йодацетата и в некоторых случаях добавлялась мочеви́на (6 М); несколько отличающиеся процедуры фиксации давали различные спектры улавливаемых продуктов, что указывает на неадекватность использованных методов. В работе тем не менее было показано, что содержание неправильно свернутого белка растет с увеличением скорости окисления. В своей следующей работе Ачариа и Таниучи [99] попытались определить положения остатков Cys в цепи лизоцима, образующих дисульфидные связи в промежуточных состояниях, обязательных для укладки физиологически активной трехмерной структуры лизоцима. С этой целью остатки цистеина последовательно подвергались необратимому блокированию. Однако никаких данных, подтверждающих наличие продуктивных метастабильных продуктов, получено не было. Т. Крейтон, анализируя эту работу, полагает, что окисление денатурированного белка в течение полутора суток кислородом воздуха в присутствии меркаптоэтанола вряд ли отвечает условиям, требуемым для решения поставленной задачи [59].

Термодинамика процесса денатурации лизоцима, как и некоторых других белков, была детально охарактеризована П.Л. Приваловым [40]. В его работе с У. Пфейлем была обнаружена высокая чувствительность энтальпии и энтропии разворачивания белковой цепи к температуре, что, согласно закону Кирхгофа, должно свидетельствовать о различии в теплоемкостях свернутого и развернутого состояний [100]. Это видно из рис. III.13, где представлены зависимости энтальпийных (H°) и энтропийных (TS°) вкладов в свободную энергию свернутой и развернутой форм лизоцима. Более высокое значение теплоемкости развернутого состояния, по мнению Привалова, Пфейля и других исследователей [100–103], связано прежде всего с температурнозависимым упорядочением молекул воды вокруг неполярных остатков, более доступных в этом случае. На рис. III.13 показаны также температурная зависимость свободной энергии Гиббса (G°) двух состояний и температурная зависимость разности $\Delta G = G^\circ_{\text{сверн.}} - G^\circ_{\text{разверн.}}$ (T_m – температура плавления нативного лизоцима, при которой $\Delta G = 0$).



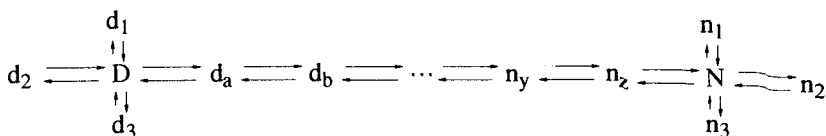
Р и с. III.13. Термодинамические параметры свернутой и развернутой форм лизоцима при pH 7,0 и различных температурах [18]

Большое изменение теплоемкости при разворачивании белка обуславливает существование температуры, при которой стабильность свернутого состояния достигает максимума [40, 101, 104]. Согласно результатам измерения свободной энергии это имеет место при $\Delta S^{\circ} = 0$, а константы равновесия – при $\Delta H^{\circ} = 0$ [105]. В любом случае стабильность уменьшается при отклонении температуры в обе стороны. Следовательно, белки могут денатурировать при двух критических температурах – более высокой от оптимального значения (T_m на рис. III.13) и более низкой. Низкотемпературное разворачивание имеет противоположные термодинамические характеристики по сравнению с высокотемпературными, за исключением изменения теплоемкости, но оно существенно не отличается [106–108].

Прочно укоренилось представление о том, что цистеинсодержащие белки являются наиболее удобными объектами исследования денатурации. Действительно, для белков с дисульфидными связями разработан комплексный экспериментальный подход к изучению структурной самоорганизации полипептидной цепи. Он включает методы, позволяющие прекращать практически мгновенно процесс ренатурации белка в любой момент времени и фиксировать образовавшиеся к этому моменту дисульфидные связи и тиоловые группы, выделять в чистом виде промежуточные продукты на любой стадии ренатурации и определять в каждом продукте число S–S-связей и места их локализации в цепи.

На основе экспериментального подхода, объединяющего отмеченные выше и некоторые другие методы, можно проводить изучение денатурации по строго логической и апробированной схеме. Она прежде всего включает получение информации о наличии дисульфидной связи в любом промежуточном продукте, что свидетельствует о сближенности соответствующих участков его полипептидной цепи. Такие данные о серии продуктов, например о моно-S-S-производных, образовавшихся на первом этапе ренатурации, создают о каждом из них специфическое стереохимическое представление. Сопоставление таких (а именно детерминированных числом и положением дисульфидных связей) представлений о всей гамме метастабильных промежуточных продуктов на пути ренатурации от флуктуирующего клубка до нативной трехмерной структуры позволяет выделить ряд связанных между собой продуктивных промежуточных состояний внутримолекулярных конвертируемых реорганизаций, ведущих этот ряд к нативной конформации. Дисульфидная связь как бы делает видимым весь процесс сборки белковой глобулы. В наиболее полной мере имеющиеся возможности реализованы пока лишь для одного белка – бычьего панкреатического трипсинового ингибитора.

Т. Крейтон, сравнивая изученный им механизм свертывания белковой цепи БПТИ с имеющимися данными по денатурации других белков, полагает, что трипсиновый ингибитор не является в этом отношении уникальным объектом [59]. Специфика его ренатурации не носит принципиального характера и легко объясняется малыми размерами молекулы, которые делают укладку полипептидной цепи более быстрой и прямолинейной по сравнению со сборкой пространственных структур высокомолекулярных белков. Он полагает, что упаковка и развертка природной полимерной аминокислотной последовательности описывается следующей кинетической формулой, общей для всех белков:



Промежуточные продукты $d_1, d_2, d_3, d_a \dots$ – состояния, энергетически менее предпочтительные макросостоянию D, с которым они находятся в неустойчивом равновесии (напомним, что само состояние D есть статистический клубок, т.е. множество флуктуирующих конформаций белковой цепи). Промежуточные продукты $n_1, n_2, n_3, n_z \dots$ – аналогичные варианты по отношению к строго детерминированной нативной конформации N. Согласно Крейтону, всем состояниям $d_1, d_2 \dots$ и $n_1, n_2 \dots$ в той или иной мере присущи черты одного из предельных состояний (D или N). Чем ближе положение промежуточного продукта к конечному продукту процесса денатурации (D) или ренатурации (N), тем ближе данное микросостояние к соответствующему макросостоянию и, следовательно, больше скорость

взаимного перехода. Наиболее медленной стадией денатурации белка является превращение микросостояний, при котором одно теряет последний признак нативной конформации, а другое приобретает первый признак статистического клубка (при ренатурации наоборот). Таким образом, по Крейтону, процесс свертывания белковой цепи заключается в постепенной потере промежуточными продуктами свойств макросостояния D и приобретении ими свойств макросостояния N, т.е. в последовательном приближении к трехмерной структуре нативного белка. Подробная трактовка белковой ренатурации и общее кинетическое уравнение полностью соответствуют двухфазной теории Брандтса и уравнению $D \rightleftharpoons N$, в котором согласно теории D и N – макросостояния, включающие наборы микросостояний (см. например, рис. III.1).

Рассмотренные здесь экспериментальные данные о денатурации белков, в том числе БПТИ, однако, трудно согласовать с простым линейным механизмом процесса, отвечающим теории двух состояний Брандтса и общей кинетической формуле Крейтона. Наиболее убедительно об этом свидетельствует, прежде всего, несоответствие между экспериментальными результатами исследования Крейтона и его же кинетическим уравнением, которое не может описать реальный механизм свертывания и разворачивания белковой цепи выбранного нами простейшего тест-объекта. В самом деле, экспериментально и самим же Крейтоном доказано, что денатурация БПТИ *in vitro* представляет собой не прямолинейный, а разветвленный процесс, и поэтому свойства его метастабильных состояний не будут строго промежуточными между свойствами предшествующих и последующих состояний (см., например, рис. III.8). Путь денатурации проходит через ряд промежуточных продуктов, которые не обладают чертами ни одного из своих макросостояний. С другой стороны, имеются промежуточные продукты, близкие по укладке цепи к одному из макросостояний, однако путь к нему проходит не через эти продукты, а через их конверсию в другие продукты, менее напоминающие пространственную форму данного макросостояния. Обнаружены многочисленные факты, касающиеся денатурации других белков, которые также не отвечают строго последовательному и, казалось бы, наиболее простому пути укладки белковой цепи в нативную конформацию. Противоречат теории Брандтса результаты обсужденных ранее исследований Икаи и Тэнфорда [49], Тейпеля и Кошланда [51], Эпштейна и соавт. [52], Гарела и Болдвина [54] и др. Предложенные в этих работах кинетические уравнения механизма денатурации не могут быть сведены ни к простейшему, ни к расширенному вариантам уравнения двухфазного перехода ($N \rightleftharpoons D$), подобного фазовому переходу первого рода.

РЕНАТУРАЦИЯ БЕЛКОВ, НЕ СОДЕРЖАЩИХ ДИСУЛЬФИДНЫЕ СВЯЗИ

В своей статье, опубликованной в 1992 г., Е. Лэттман и Г. Раузе, анализируя некоторые особенности укладки белковой цепи в нативную конформацию, дают следующую оценку научной значимости проблемы свертывания белка и сегодняшнему состоянию ее разработки: "Несмотря на интенсивные исследования, обобщенное физическое понимание процесса свертывания остается туманным, а сама проблема свертывания белка, т.е. понимание того, как аминокислотная последовательность определяет трехмерную структуру, еще ждет своего решения. ... эта проблема предстает как один из наиболее значимых научных вызовов 20-го века" [109. С. 439]. Аналогичные высказывания содержатся в работах многих исследователей, в том числе таких авторитетов в этой области, как Т. Крейтон и А. Фершт. Первый полагает, что наука по существу еще не приблизилась к решению проблемы свертывания белка [18], а второй, отмечая сложность проблемы, называя ее даже "устрашающей задачей" ("daunting task"), пишет: "Выявление принципов, управляющих свертыванием, представляет громадную нерешенную проблему, поскольку еще невозможно рассчитать de novo путь свертывания белка или даже выяснить является ли известная структура стабильной" [110. С. 5].

Действительно, проблема структурной самоорганизации белка — это целый комплекс сложнейших экспериментальных и теоретических задач. Однако главная трудность их решения, по нашему мнению, состоит в отсутствии аналогий, так как спонтанное возникновение трехмерной структуры белка является уникальным явлением живой природы. С физической точки зрения это явление заключается в самопроизвольной трансформации энергии хаотического движения в целенаправленную механическую работу создания высокоорганизованной молекулярной системы. Белки представляются почти единственными в природе (по меньшей мере, самыми совершенными и распространенными) автоматическими преобразователями энергии теплового и броуновского движения в энергию более высокого ранга — механическую и энергию стереоспецифических внутримолекулярных взаимодействий. Появившаяся спонтанно из хаоса упорядоченная трехмерная структура белка далее способна к трансформации всех других, необходимых для жизни видов энергии. Присущая белкам способность к структурной самоорганизации есть элементарное фундаментальное качество живой материи, обуславливающее специфические особенности биологических систем всех последующих ступеней иерархической лестницы живого.

Проблема свертывания белка, по нашему мнению, может быть разделена на следующие пять взаимосвязанных задач.

1. Раскрытие кинетического механизма пространственной само-

организации молекулы белка, т.е. установление всех промежуточных форм белковой цепи на пути ее свертывания от состояния статистического клубка до нативной биологически активной трехмерной структуры.

2. Разработка общей теории свертывания белковой цепи, т.е. системы принципов, отражающих все важнейшие особенности структурной самоорганизации молекулы белка: беспорядочно-поисковый механизм сборки природной аминокислотной последовательности, самопроизвольный характер возникновения и протекания всех стадий образования высокоупорядоченной трехмерной структуры, высокая скорость и безошибочность процесса.

3. Создание физической теории структурной организации молекул белка и соответствующего расчетного метода, позволяющих предсказывать только на основе известной аминокислотной последовательности координаты всех атомов нативной трехмерной структуры и количественно оценивать ее конформационные возможности.

4. Количественное априорное представление спонтанного свертывания конкретной белковой цепи в нативную трехмерную структуру как неизбежный результат действия беспорядочно-поискового механизма.

5. Решение обратной структурной задачи, т.е. создание теории и метода, позволяющих целенаправленным и контролируемым образом изменять аминокислотную последовательность по заранее заданной пространственной структуре мутантного белка.

Вплоть до последнего времени изучение проблемы свертывания белка было направлено прежде всего на поиск экспериментальных методов исследования промежуточных состояний, т.е. на решение первой задачи. Что касается второй задачи, то многочисленные попытки ее решения чисто эмпирическим путем вот уже несколько десятилетий скользят по поверхности гипотетическо-феноменологического уровня. К рассмотрению трех последующих задач еще вообще не приступали, поскольку для этого необходимо решение двух предшествующих.

Важнейшим достижением в познании механизма структурной самоорганизации белковых молекул, явились работы Т. Крейтона 1970—1980-х годов, особенно посвященные экспериментальному исследованию пути свертывания панкреатического трипсинового ингибитора и созданию общего подхода к анализу процесса обратимой денатурации цистеинсодержащих белков (гл. 12). Комплекс аналитических методов, как созданных самим Крейтоном, так и известных ранее, позволил надежно идентифицировать дисульфидные связи и управлять процессом их образования и разрушения, что сделало возможным следить за ходом свертывания белковой цепи по промежуточным S—S-продуктам. Разработанный подход, очевидно, неприемлем для белков, лишенных остатков Cys или не образующих дисульфидных связей. Кроме того, он не мог быть использован и для более детального исследования самих цистеинсодержащих белков, так как позволяет судить о последовательности образующихся по ходу сборки промежуточных продуктов и

происходящих при этом конформационных изменений лишь по нескольким точкам, отвечающим появлению одной, двух, ... S—S-связей. По-видимому, нет оснований считать, что белки, не содержащие S—S-мостиков, укладываются в нативную конформацию принципиально иначе, чем белки с такими мостиками. Поэтому экспериментальное изучение механизма их ренатурации, неизбежно требующее создания более тонких методов структурного анализа промежуточных состояний (по сравнению с методами дисульфидных связей), имеет общее значение в исследовании свертывания белковой цепи.

13.1. САЙТ-НАПРАВЛЕННЫЙ МУТАГЕНЕЗ

Долгое время белки, не содержащие остатков Cys, считались неудобными объектами изучения механизма свертывания, и уровень их исследований в этом плане значительно уступал цистеинсодержащим белкам. Ситуация начала меняться во второй половине 1980-х годов и к настоящему времени две группы белков, если не поменялись местами, то во всяком случае сравнялись по проявляемому к ним вниманию и результатам исследования. Повышенный интерес к белкам без дисульфидных связей был вызван появлением универсального экспериментального метода А. Фершта, открывшего широкие перспективы, перед исследованиями структуры и стабильности всех состояний белковой цепи на пути ее свертывания [110—113]. Он будет предметом детального анализа в этом и следующем разделах. Но сначала несколько слов о предшествующих работах в данной области.

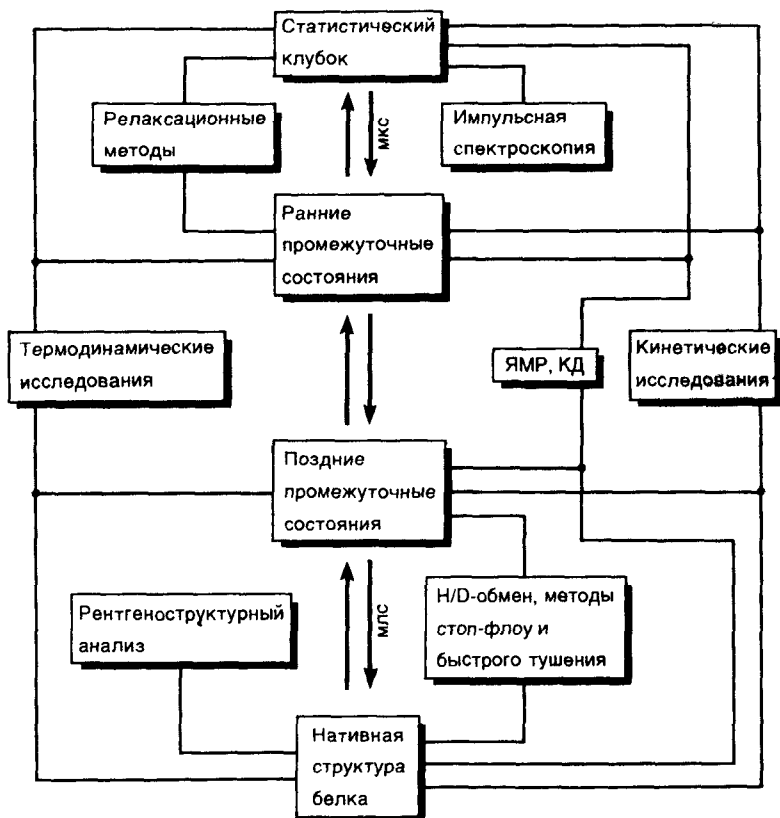
В 1972 г. Д. Сачс и соавт. [114] разработали иммунологический метод, который был использован для изучения процесса ренатурации белков, не содержащих дисульфидных связей. Метод основан на предположении о двухфазном механизме свертывания и идентификации конформационных состояний фрагментов нативной трехмерной структуры белка с помощью специально подобранных антител. Далее выявляются зависимости между константой равновесия предельных состояний (D и N) и константами связывания антител с белковыми фрагментами. Д. Сачс и соавт. [115] применили метод для определения константы равновесия $N \rightleftharpoons D$ стафилококковой нуклеазы, а Дж. Харрел и соавт. [116] и Б. Фурье и соавт. [117] — для изучения конформаций промежуточных состояний миоглобина. О характере получаемой при исследовании иммунохимического метода информации можно судить по результатам рассмотренной в разд. 9.4. работы Л. Чавеца и Г. Шераги [86], применивших его в исследовании ренатурации рибонуклеазы А.

Известно несколько попыток фиксировать процесс сборки белка быстрым понижением температуры с последующим определением промежуточных продуктов с помощью электрофореза [118] и ЯМР спектроскопии [119]. Несмотря на положительное значение полученных результатов, они имели, однако, частный характер и не оказали

заметного влияния на ситуацию с исследованиями белков, в трехмерных структурах которых отсутствуют дисульфидные связи. В кинетических исследованиях слежение за процессом свертывания белковой цепи осуществлялось методом флуоресценции или поглощения. Полезная информация, имеющая, однако, также интегральный характер, получалась с помощью спектров кругового дихроизма, метода, чувствительного в области 220–230 нм к содержанию α -спиралей [120]. Более детальные сведения о процессе давало совместное использование методов остановленной струи, ЯМР и изотопного обмена N/D и H/T, позволяющих не только определять общее содержание вторичной структуры, но и фиксировать ее образование в отдельных местах аминокислотной последовательности [121–124].

Обратимся теперь к методу Фершта, точнее подходу, включающему целый комплекс методов. Своим появлением он обязан становлению в начале 1980-х годов генетической инженерии, сделавшей доступными любые полипептидные последовательности стандартных аминокислот. В результате открылась уникальная возможность получения сколь угодно представительного набора искусственных белковых аналогов, отличающихся от природного объекта числом и местом аминокислотных замен [125, 126]. На основе сайт-направленного мутагенеза был разработан метод экспериментальной оценки энергии невалентных взаимодействий, впервые опробованный при изучении функционирования тирозил-тРНК-синтетазы [127–129]. Выявив в этих работах возможность получать количественные данные о структуре и энергетике боковых цепей при изменении аминокислотной последовательности, Фершт и соавт. [130–132] предприняли попытку использовать метод в исследовании обратимой денатурации белков, причем сразу в двух аспектах. Во-первых, в создании принципиально нового метода изучения механизма свертывания белковой цепи на уровне отдельных аминокислотных остатков. Сайт-специфические мутантные белки служат здесь инструментами — зондами, позволяющими получать тонкую структурную информацию о процессе самоорганизации белка, недоступную другими экспериментальными методами. Во-вторых, в разработке новой стратегии исследования ренатурации белков с помощью обычно используемых методов: ЯМР- и КД-спектроскопии, остановленной струи, изотопного обмена и т.д. Существенное изменение ситуации обусловлено появлением у каждого метода вместо одного объекта исследования многочисленной группы его целенаправленно модифицированных аналогов. Расширение материальной базы открыло перспективу для повышения интерпретационных возможностей экспериментальных методов, особенно при их комплексном использовании. Реализация возросших возможностей потребовала совершенствования методологических подходов.

Схематическое представление пути свертывания белковой цепи и некоторые из существующих методов его исследования показаны на рис. III.14, заимствованном с небольшими изменениями и дополнениями из работы Фершта [110]. Теоретической основой изучения механизма обратимой денатурации белков Фершт считает равновесную тер-

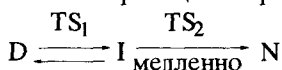


Р и с. III.14. Методы исследования пути свертывания белковой цепи [110]

модинамику и формальную кинетику. Последняя, он полагает, особенно необходима в анализе переходных состояний и короткоживущих промежуточных продуктов. Кинетическая шкала процесса разделена на два режима (меньше и больше одной миллисекунды), отвечающих ранним, обычно более быстрым, и поздним, более медленным, стадиям ренатурации. Соответствующее деление имеет место и между методами исследования. Например, релаксационные методы, такие, как методы теплового удара и резкого повышения давления, фиксирующие конформационные изменения, происходящие за 1—100 мкс, используются при изучении денатурированного состояния белковой цепи и начального этапа ее ренатурации. Методы Н/Д и Н/Т обменов (амидного протона), остановленной струи и быстрого тушения флуоресценции, напротив, — при изучении завершенной структуры белка и непосредственно предшествующих ее образованию промежуточных продуктов. Некоторые методы (ЯМР, КД, иммунологический) могут быть использованы для изучения конформационных состояний на всех стадиях свертывания. К ним относится и подход сайт-направленного

мутагенеза, имеющий, как отмечалось, два назначения: получение качественно новой информации о пути свертывания белковой цепи и как неиссякаемый источник мутантных белков.

Для раскрытия пути ренатурации и побудительных мотивов процесса требуется прежде всего идентифицировать промежуточные состояния белковой цепи (I), посредством которых реализуется реакция перехода развернутого состояния (D) в свернутое (N). Согласно общепринятой трактовке явления денатурации как равновесного, обратимого процесса, состояния I находятся на кривой изменения свободной энергии вдоль координаты реакции в энергетических минимумах, разделенных потенциальными барьерами, отвечающими переходным состояниям (TS). Как правило, промежуточные соединения I термодинамически неустойчивы. Они могут быть обнаружены лишь кинетически, причем в том случае, если их образование предшествует скорости-лимитирующей стадии, а свободная энергия совпадает или ниже энергии состояния D. Рис. III.15 иллюстрирует три возможных варианта протекания простейшей реакции свертывания



при нестабильном промежуточном состоянии I. Переменной во всех случаях является энергия состояния D, а неизменными — относительная энергия состояний I, TS₂ и N. При условии $\Delta G_I^0 > \Delta G_D^0$ (рис. III.15,а) увеличение стабильности I ведет к уменьшению потенциального барьера и, следовательно, к увеличению стабильности N. Это продолжается пока ΔG_I^0 не станет равной ΔG_D^0 (рис. III.15,б). При $\Delta G_I^0 < \Delta G_D^0$ (рис. III.15,в) скорость свертывания и стабильность N не увеличивается; промежуточное состояние I в таком случае становится доминирующей формой несвернутого белка в условиях денатурации.

В методе Фершта денатурация и ренатурация белковых цепей дикого и мутантного типов описываются, как это принято, с помощью экспериментально измеряемых констант равновесия (K) и скорости (k). Предполагая оба процесса равновесными и, следовательно, термодинамически обратимыми, что также является общепринятым, определяют изменения свободной энергии при известных величинах K и k соответственно по уравнению изотермы Вант-Гоффа

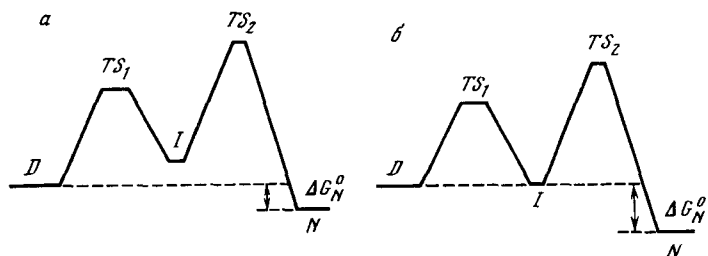
$$\Delta G = -RT \ln K$$

и уравнению Аррениуса

$$K = A e^{-\Delta G^*/RT},$$

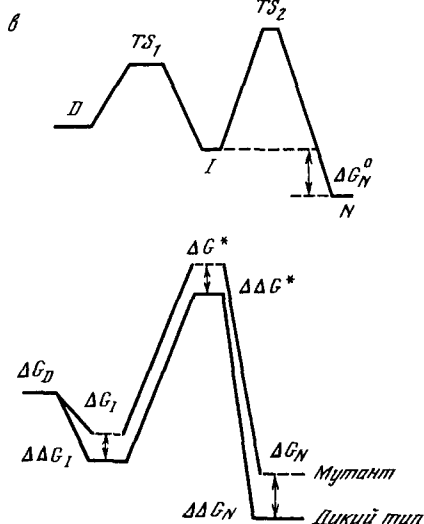
где R — газовая постоянная, T — абсолютная температура, A — предэкспоненциальный множитель уравнения Аррениуса, ΔG — разница свободной энергии основных состояний, ΔG^* — разница свободной энергии переходного и основного состояний (энергия активации).

По рассчитанным изменениям свободной энергии вдоль координаты



Р и с. III.15. Диаграммы, иллюстрирующие влияние соотношения свободной энергии состояний D и I на скорость свертывания белковой цепи и стабильность состояния N

$a - \Delta G_D^0 < \Delta G_I^0$; $b - \Delta G_D^0 = \Delta G_I^0$; $c - \Delta G_D^0 > \Delta G_I^0$ [132]



Р и с. III.16. Профили изменений свободной энергии белков дикого и мутантного типов вдоль координаты ренатурации белковой цепи [110]

реакции находятся различия в энергетических уровнях дикого и мутантного белков и строится разностная диаграмма, представленная на рис. III.16.

Центральная идея метода Фершта заключена, однако, не в описанной, достаточно рутинной, хотя и необходимой процедуре, а в выборе мутантов. Чтобы дать полезную информацию о стабильности и пути свертывания белковой цепи, они должны удовлетворять следующим требованиям: 1) при свертывании не отклоняться от пути ренатурации интактной аминокислотной последовательности; 2) в свернутом состоянии иметь пространственную структуру, существенно не отличающуюся от трехмерной структуры нативного белка; 3) в развернутом состоянии иметь структуру, не отличающуюся от состояния статистического клубка нативного белка; 4) на всем пути свертывания мутантные аминокислотные остатки не должны образовывать невалентных контактов с новыми партнерами [113]. Перечисленным условиям, по Фершту, будут удовлетворять мутантные последовательности с единичными заменами аминокислотных остатков на более простые, обладающие менее объемными боковыми цепями. Иными

словами, предполагается, что изменения в стабильности тех или иных состояний и скорости свертывания нативного белка и мутанта, отличающихся одним остатком, обусловлены влиянием той атомной группы, которая отсутствует у искусственного аналога. В этом случае при замене, например, Ile и Val оценивается вклад группы $C^{\delta}H_3$ изолейцина интактной последовательности в значения термодинамических и кинетических параметров процесса ее ренатурации, при замене Ile на Ala — групп $C^{\gamma}H_3$, $C^{\gamma}H_2$ и $C^{\delta}H_3$, Ile на Gly — всей боковой цепи изолейцина, а при замене Ser на Ala или Tyr на Phe — вклады гидроксильных групп. Такой подход основывается на предположении об аддитивности невалентных взаимодействий боковых цепей, которое, при прочих равных условиях, будет тем более справедливо, чем меньше различий между соответствующими остатками дикого и мутантного типов.

Привлечение к проблеме свертывания белка сайт-направленного мутагенеза и использование уравнений равновесной термодинамики и формальной кинетики позволили Фершту и соавт. предпринять попытку решить две задачи. Первая из них основывалась на опытных значениях констант равновесия и заключалась в определении вызванных мутациями изменений в стабильности основных состояний белковой цепи. Ее цель состояла в установлении эмпирических соотношений между глобальной свободной энергией и энергией невалентных взаимодействий боковых цепей в различных областях белковой глобулы [133]. Вторая задача исходила из результатов кинетических измерений процессов свертывания и разворачивания нативного белка и мутантов и имела цель обнаружить изменения энергии промежуточных состояний и энергии активации (рис. III.16). Различия в энергетических уровнях промежуточных ($\Delta\Delta G_1$) и переходных ($\Delta\Delta G^*$) состояний помогали определить их положения на пути структурной самоорганизации белковой цепи. При этом каждая аминокислотная замена служила своеобразной репортерской меткой наблюдаемого изменения, происходящего на мутированном участке по ходу ренатурации или денатурации.

Для количественной характеристики структурных изменений в процессах свертывания и разворачивания белковой цепи дикого и мутантного типов Фершт и соавт. [113, 130] ввели специальный параметр ϕ , близкий по смысловому значению параметру β в уравнении Бренстеда, связывающем константы равновесия (K) и скорости (k) реакции серии родственных по химическому строению соединений

$$\ln k = \text{const} + \beta \ln K,$$

где β — коэффициент Бренстеда, являющийся мерой подобия структуры переходного состояния структуре исходной молекулы. При сохранении в переходном состоянии расщепляемой связи $\beta = 0$, а при ее разрыве $\beta = 1$. Эквивалентной формой уравнения Бренстеда является соотношение

$$\Delta G^* = \text{const} + \beta \Delta G_{\text{eq}},$$

где ΔG^* — энергия активации, ΔG_{eq} — свободная энергия равновесного состояния. По отношению к двум родственным соединениям уравнение Бренстеда может быть записано в упрощенной форме

$$\beta = \frac{\Delta \Delta G^*}{\Delta \Delta G_{eq}}.$$

А. Фершт и сотрудники предположили, что зависимость между константами равновесия и константами скорости реакции свертывания нативного белка и белка, мутированного описанным выше способом, сходна уравнению Бренстеда, и поэтому ввели аналогичный β параметр ϕ , определяемый из соотношений разностей свободной энергии промежуточных, переходных и свернутых состояний аминокислотных последовательностей нативного и мутантного белков:

$$\phi_I = \frac{\Delta \Delta G_I}{\Delta \Delta G_N} \text{ и } \phi^* = \frac{\Delta \Delta G^*}{\Delta \Delta G_N}.$$

Значения ϕ для денатурации и ренатурации связаны между собой простой зависимостью:

$$\phi_N = 1 - \phi_D.$$

Интерпретация значений параметра ϕ более сложна, чем интерпретация β , из-за нелинейной зависимости свободной энергии рассматриваемых состояний свертываемых белковых цепей. Имеются лишь две ситуации: $\phi = 0$ и $\phi = 1$, при которых параметр ϕ трактуется однозначно и совпадает с коэффициентом Бренстеда. Значение $\phi_N = 0$ (случай ренатурации) показывает, что структура аминокислотной последовательности в месте мутации нативного белка и его аналога находится в полностью развернутом состоянии, а $\phi_N = 1$ — полностью свернутом (при денатурации наоборот). Промежуточные значения ϕ свидетельствуют о частичном свертывании или частичном развертывании белковой цепи.

Для оценки вклада в термодинамику и кинетику процесса невалентных взаимодействий между двумя конкретными боковыми цепями (X и Y) Ферштом и соавт. [134—136] предложен метод так называемого двойного мутантного цикла. Он требует исследования, наряду с нативным белком E—XY, трех его мутантов E—X, E—Y и E, образующих циклическую систему, представленную на рис. III.16. При соблюдении требований, сформулированных для мутантов с одиночными заменами, двойной мутантный цикл позволит определить свободную энергию парных взаимодействий боковых цепей, используя соотношение

$$\Delta \Delta G_{XY} = \Delta G_{E-XY} - (\Delta G_{E-X} + \Delta G_{E-Y}) + \Delta G_E.$$

Переходя от $\Delta \Delta G_{XY}$ к параметру ϕ , можно по значению последнего выяснить влияние невалентных взаимодействий X с Y на ход процесса. Разработанный Ферштом и соавт. [137—141] подход к изучению термодинамических и кинетических аспектов свертывания белковой

цепи с привлечением сайт-направленного мутагенеза позволил впервые в научной практике последовательно проанализировать все этапы формирования трехмерной структуры белка (барназы), не содержащего дисульфидных связей. Рассмотрение цикла работ о барназе предварим кратким описанием принципиальной схемы такого рода исследований.

1. Изучение обратимой денатурации начинается с тщательного визуального анализа трехмерной структуры белка с целью выявления остатков, которые предположительно могут играть важную роль в структурной стабилизации и кинетике свертывания белковой цепи.

2. Модификация потенциально важных для денатурации меж-остаточных взаимодействий путем соответствующих изменений боковых цепей актуальных остатков и сайт-направленного мутагенеза. Составление оптимального набора мутантов и их синтез методами генетической инженерии.

3. Термодинамические и кинетические экспериментальные исследования механизма ренатурации (денатурации) нативного белка и мутантов; определение констант равновесия и скорости процессов; расчет изменений свободной энергии стабильных структур, промежуточных и переходных состояний; построение энергетических профилей путем свертывания белковых цепей дикого и мутантного типов.

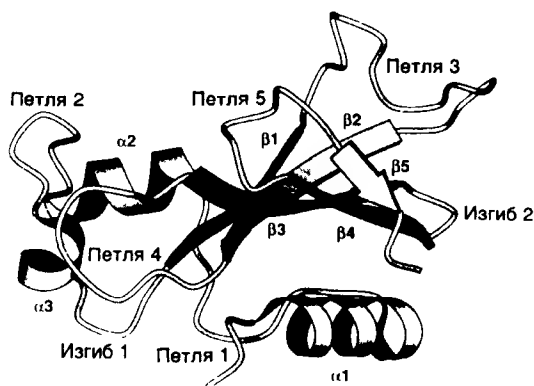
4. Построение разностных энергетических диаграмм, показывающих различия в уровнях энергии всех состояний на пути свертывания нативного белка и мутантов.

Реализация процедуры приводит к выяснению эмпирических зависимостей между важными для свертывания белковой цепи взаимодействиями боковых цепей и параметрами, характеризующими кинетику, равновесное состояние и механизм ренатурации. Каждая мутация, которая в рассматриваемом методе отличается от дикого типа одной атомной группой у одного аминокислотного остатка, позволяет количественно оценить ее парциальное воздействие на скорость свертывания и стабильность трехмерной структуры.

13.2. РЕНАТУРАЦИЯ БАРНАЗЫ

Первым и пока что единственным белком, денатурация которого изучена методом Фершта, является барназа — внеклеточная рибонуклеаза из *Bacillus amyloliquefaciens*. Ее аминокислотная последовательность включает 110 остатков. Пространственное строение белковой молекулы в кристалле изучено методом рентгеноструктурного анализа с разрешением 1,9 Å [142, 143], а в растворе — с помощью ЯМР-спектроскопии [144]. Барназа обратимо денатурирует при изменении температуры, введении додецилсульфата натрия, мочевины и гуанидингидрохлорида [145, 146]. При равновесных состояниях свертывание и разворачивание цепи соответствует двухфазному процессу ($D \rightleftharpoons N$), изменение свободной энергии по ходу которого было измерено с удовлетворительной точностью [147—149]. Белковая цепь

Р и с. III.17. Схематическое представление трехмерной структуры барназы [110, 143]



фермента не содержит остатков Cys, и поэтому при денатурации легко разворачивается полностью, принимая состояние истинного статистического клубка. В нативной структуре три остатка Pro в последовательности барназы имеют *транс*-конфигурацию пептидной группы и, следовательно, *цис-транс*-изомеризация пролина практически не влияет на кинетику свертывания.

Барназа, по классификации М. Левитта и С. Чотиа, относится к группе белков $\alpha+\beta$ [150]. Половина структуры со стороны N-конца последовательности содержит три α -спирали, образованные остатками 6—18, 26—34 и 41—46, а вторая половина со стороны C-конца — пять антипараллельных β -складчатых листов, включающих остатки 50—55, 70—76, 85—91, 94—99 и 106—108. Таким образом, 57 остатков белка образуют регулярные вторичные структуры, а 53 — нерегулярные. Схематическое представление трехмерной структуры барназы приведено на рис. III.17. Анализ пространственного строения привел авторов к убеждению, что нативная структура барназы удерживается прежде всего посредством дисперсионных взаимодействий боковых цепей так называемых гидрофобных остатков [137]. Последние входят почти во все элементы вторичной структуры и, следовательно, участвуют в стабилизации конформационного состояния всей белковой глобулы. В пространстве они сосредоточены в трех областях, где образуют экранированные от воды плотноупакованные нуклеации Nucl₁, Nucl₂ и Nucl₃ (табл. III.1).

Наиболее сильное стабилизирующее воздействие на формирование структуры барназы оказывает, очевидно, нуклеация Nucl₁ (рис. III.18). В нее входят боковые цепи 13 остатков, шесть из которых располагаются в N-концевой части последовательности, а остальные — в C-концевой (табл. III.1). Боковая цепь Ile-88, находящаяся в центре нуклеации и взаимодействующая практически со всеми ее боковыми цепями, по-видимому, является цементирующей структуру Nucl₁. Можно полагать, что назначение Nucl₁ в процессе свертывания заключается в связывании противоположных участков белковой цепи, чему должно предшествовать структурирование спирали α_1 и складчатых листов β_1 ,

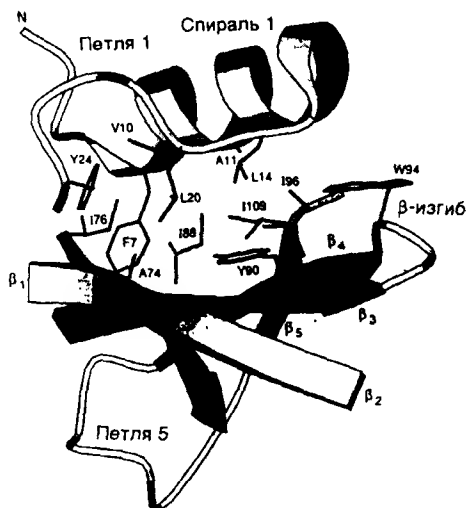
Элементы вторичной структуры и гидрофобные нуклеации нативной конформации барназы

Элементы вторичной структуры		Гидрофобные нуклеации		
Название	Участок аминокислотной последовательности	Nucl ₁	Nucl ₂	Nucl ₃
N-Конец	1—5	—	—	—
α_1 -Спираль	6—18	Phe-7, Val-10, Ala-11, Leu-14	—	—
Ω_1 -Петля	19—27	Leu-20, Tyr-24	Ile-25	—
α_2 -Спираль	26—34	—	Ala-30, Leu-33	—
Ω_2 -Петля	30—40	—	Trp-35	—
α_3 -Спираль	41—46	—	Leu-42, Val-45	—
β_1 -Изгиб	47—49	—	—	—
β_1 -Структура	50—55	—	Ile-51	—
Ω_3 -Петля	56—69	—	—	Phe-56, <u>Leu-63</u>
β_2 -Структура	70—76	Ala-74, Ile-76	—	Trp-71
Ω_4 -Петля	77—84	—	Tyr-78	—
β_3 -Структура	85—91	<u>Ile-88</u> , Tyr-90	—	<u>Leu-89</u>
β_2 -Изгиб	92—94	—	—	—
β_4 -Структура	94—99	Tyr-94, Ile-96	—	Tyr-97
Ω_5 -Петля	100—104	—	—	Tyr-103
β_5 -Структура	105—108	—	—	Phe-106
C-Конец	109—110	Ile-109	—	—

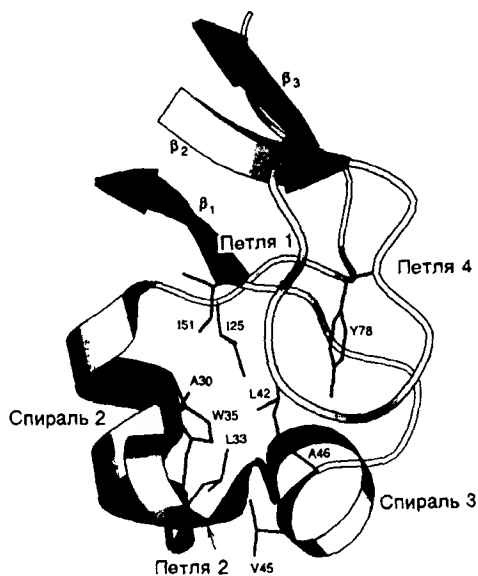
Примечание. Подчеркнуты остатки, боковые цепи которых находятся в центре нуклеации.

β_2 и β_4 . Вторая нуклеация Nucl₂ объединяет боковые цепи восьми гидрофобных остатков спиралей α_2 и α_3 , складчатого листа β_1 и петель Ω_1 , Ω_2 и Ω_4 и, следовательно, стабилизирует среднюю часть аминокислотной последовательности барназы (табл. III.1; рис. III.19). Если в Nucl₁ дисперсионные взаимодействия боковых цепей имеют преимущественно радиальную направленность с центром Ile-88, то в Nucl₂ они образуют потенциальную поверхность сложной пространственной фигуры. В нуклеации Nucl₃ (рис. III.20) ассоциированы боковые цепи семи остатков β -структур (β_2 – β_5) и Ω -петель (Ω_3 и Ω_5). Центрами взаимодействий являются расположенные друг против друга боковые цепи Leu-63 и Leu-89. При попытке в общем виде отразить последствия гидрофобного эффекта на свертывание белковой цепи барназы можно сказать, что он приводит к образованию трехмерной структуры молекулы, имеющей в отношении своего главного стабилизирующего

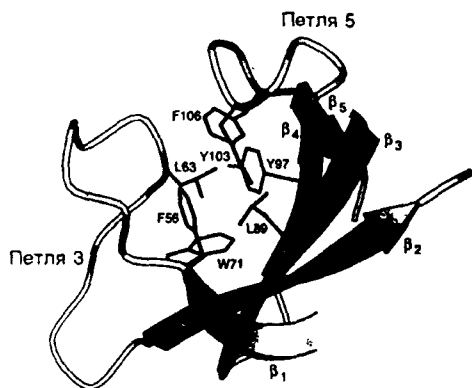
Р и с. III.18. Гидрофобная нуклеация $Nucl_1$ трехмерной структуры барназы [147]



Р и с. III.19. Гидрофобная нуклеация $Nucl_2$ трехмерной структуры барназы [147]



фактора — дисперсионных взаимодействий — вид своеобразного сэндвича. В его центральном слое расположена β -структурная система (β_1 – β_5), частично экранированная от контактов с водой с одной стороны α_1 -спиралью ($Nucl_1$), с другой — неупорядоченными участками Ω_3 - и Ω_5 -петель ($Nucl_3$), а сбоку — α_2 -спиралью и Ω_1 -, Ω_4 -петлями ($Nucl_2$). Анализ трехмерной структуры барназы, который в оригинальном изложении Фершта и соавт. [137, 147] содержит ряд деталей, опущенных здесь, позволил приступить к рассмотрению следующей задачи



Р и с. III.20. Гидрофобная нуклеация Nuc13 трехмерной структуры барназы [147]

— выбору сайт-направленных единичных и мультиплетных циклических аминокислотных замен и составлению, таким образом, набора мутантов, подлежащих биосинтезу и термодинамическому и кинетическому изучению, которое, по мнению авторов, должно привести к оп-

ределению стабильности нативной конформации белка и установлению механизма ее образования.

Отобранная совокупность объектов дальнейшего исследования составила 64 мутанта, из которых 59 отличались от дикого типа барназы одним остатком, четыре — двумя и один — тремя. Замещение произведено не только в местах скопления гидрофобных остатков (Nuc1₁₋₃), но и во всех других областях трехмерной структуры. Далеко не всегда это были замены остатков с более объемными алифатическими боковыми цепями на менее объемные, типа Ile на Val или Val на Ala. Часто мутировались остатки, несущие положительные (Arg, Lys) и отрицательные (Asp, Glu) целочисленные заряды, соответственно на Gly, Ala и Ala, Gly, Asn, а также остатки с гидроксильными группами (Thr, Ser, Tyr) на Gly, Ala, Val, Arg, Phe. Почти во всех экспериментах денатурация белковой цепи проводилась под действием мочевины. Многие исследования показали, что свободная энергия разворачивания в этом случае изменяется пропорционально концентрации денатуранта [(H₂N)₂CO] и может быть определена по формуле:

$$\Delta G_D = \Delta G_D^{H_2O} - m \cdot [(H_2N)_2CO],$$

где $\Delta G_D^{H_2O}$ — свободная энергия разворачивания в водном растворе, в котором отсутствует мочевина, а m — эмпирический параметр, пропорциональный увеличению экспонированной растворителю поверхности белковой цепи при денатурации [151]. Изменение стабильности структуры барназы есть разность между свободной энергией белка дикого типа и энергией соответствующего искусственного аналога ($\Delta\Delta G_D$).

Напомним, что идея исследования стабильности пространственной структуры барназы заключалась в предположении, что при минимальном сокращении боковой цепи того или иного остатка происшедшее вследствие этого увеличение свободной энергии ($\Delta\Delta G_D$) обусловлено потерей стабилизирующего вклада невалентных взаимодействий именно той атомной группы, которая исчезла в мутанте. А. Фершт, излагая основы своего метода, в частности, пишет:

**Изменения свободной энергии разворачивания под действием мочевины белковой цепи
барназы при уменьшении объема алифатических боковых цепей**

Ile→Val		Ile→Ala		Val→Ala	
Номер остатка	$\Delta\Delta G_D$, ккал/моль	Номер остатка	$\Delta\Delta G_D$, ккал/моль	Номер остатка	$\Delta\Delta G_D$, ккал/моль
4	0,6	4	1,3	10	3,4
25	1,1	25	3,5	36	1,3
51	1,8	51	4,7	45	1,7
55	0,3	55	1,1		
76	0,8	76	1,9		
88	1,3	88	4,0		
96	0,9	96	3,2		
109	0,8	109	2,1		

"К идеальным относятся мутации, которые исключают небольшие части боковых цепей, образующие простые и определенные взаимодействия, и при этом не вызывают каких-либо других изменений в структуре, кроме отсутствия взаимодействий, связанных с удаленной частью. Мы назвали такие мутации "ненарушающими делециями" [110, С. 6]. Наблюдаемые факты могут получить в методе Фершта однозначные трактовки при непременном соблюдении условия, что все замены в 64 отобранных мутантах соответствуют "ненарушающим делециям", т.е. являются идеальными. Только в этом случае изменения свободной энергии искусственных аналогов по отношению к энергии естественного белка будут подчиняться правилу аддитивности и, следовательно, отвечать представлению общей энергии в виде суммы парциальных энергетических вкладов атомных групп, значения которых не зависят от места мутации и природы боковой цепи. Ситуация здесь в принципе аналогична той, которая в свое время сложилась при попытке представить молекулярную рефракцию как аддитивную сумму рефракций отдельных атомных групп. Эксперимент подтвердил реальность такого представления.

Предположение о возможности аддитивного представления энергии обратимой денатурации белка впервые сделано, правда, в неявной форме, в работах Фершта и соавт. [110, 137]. Рассмотрим насколько оно справедливо в самых благоприятных случаях, т.е. при заменах, названных Ферштом "ненарушающими делециями" и отнесенных к идеальным мутациям. Результаты экспериментального исследования стабильности соответствующих мутантов представлены в табл. III.2. При соблюдении правила аддитивности одинаковые мутации должны приводить к одним и тем же или достаточно близким величинам изменений свободной энергии разворачивания цепи, а величина $\Delta\Delta G_D$ в случае Ile → Ala должна приблизительно равняться сумме изменений энергии $\Delta\Delta G_D$, вызванных заменами Ile на Val и Val на Ala. В действительности, опытные значения $\Delta\Delta G_D$ попадают в перекрывающиеся

Т а б л и ц а III.3

**Изменения свободной энергии
развертывания под действием мочевины
белковой цепи барназы при замене остатков
Asp и Ser на Ala**

Asp→Ala		Ser→Ala	
Номер остатка	$\Delta\Delta G_D$, ккал/моль	Номер остатка	$\Delta\Delta G_D$, ккал/моль
8	0,9	31	-0,1
12	0,3	91	1,9
54	3,0	92	2,8

широкие интервалы 0,3—1,8 ккал/моль (Ile → Val), 1,1—4,7 ккал/моль (Ile → Ala) и 1,3—3,4 ккал/моль (Val → Ala), отличааясь в каждом из них приблизительно в шесть, четыре и три раза.

В табл. III.3 сопоставлены величины $\Delta\Delta G_D$, полученные при заменах остатков Asp и Ser барназы, способных образовывать эффективные электростатические контакты и водородные связи, на остаток Ala, лишенный таких возможностей. Полученные Ферштом

и соавт. [137] результаты мутаций столь различны, что вряд ли по ним можно сказать что-либо определенное о роли боковых цепей аспарагиновой кислоты и серина в стабилизации трехмерной структуры белка.

В табл. III.4 приведены величины изменений свободной энергии денатурации мутантов, полученных заменой одного остатка нативного белка на существенно отличающиеся по химическому и пространственному строению остатки (Thr → X, Tyr → X) или заменой различных по своей природе остатков на глицил (X → Gly). Данные этой таблицы, в отличие от предыдущей, скорее удивляют близостью значений $\Delta\Delta G_D$ у мутантов, имеющих столь разные остатки.

Например, замены в последовательности барназы Thr-16 на Arg и Lys-27 на Gly изменяют свободную энергию Гиббса всего на -0,5 и 0,4 ккал/моль, в то время как при заменах Thr-6 на Ala и Glu-29 на Gly изменения составляют 2,1 и 1,8 ккал/моль. Следовательно, и здесь энергия межостаточных невалентных взаимодействий не может быть представлена аддитивной суммой неизменяющихся парциальных вкладов.

Такой же вывод с неизбежностью следует из данных, приведенных в табл. III.5, где сопоставлены величины изменений свободной энергии развертывания белковой цепи, имеющей единичные, двойные и тройную циклические мутации. Легко видеть, что величины $\Delta\Delta G_D$ последовательности с заменами двух или трех остатков не являются суммой $\Delta\Delta G_D$ двух или трех последовательностей с единичными заменами в тех же местах и на те же остатки, т.е. $\Delta\Delta G_D(\text{Ala-Ala}) = \Delta\Delta G_D(X_i \rightarrow \text{Ala}) + \Delta\Delta G_D(X_j \rightarrow \text{Ala})$, а $\Delta\Delta G_D(\text{Ala-Ala-Ala}) = \Delta\Delta G_D(X_i \rightarrow \text{Ala}) + \Delta\Delta G_D(X_j \rightarrow \text{Ala}) + \Delta\Delta G_D(X_k \rightarrow \text{Ala})$. При соблюдении аддитивности величина $\Delta\Delta G_D$ мутанта (Ala-8-Ala-10) была бы равна около 4,3 ккал/моль, тогда как в действительности она составляет всего 0,4 ккал/моль, а величина $\Delta\Delta G_D$ мутанта (Ala-8-Ala-12-Ala-110) должна была бы быть около 1,6 ккал/моль, а она равна -0,1 ккал/моль.

Таким образом, имеющиеся экспериментальные данные о различиях в свободной энергии нативной барназы и ее мутантов про-

Т а б л и ц а III.4

Изменения свободной энергии разворачивания под действием мочевины белковой цепи барназы при замене некоторых аминокислотных остатков

Thr→X			X→Gly			Tyr→X		
Номер остатка	X	$\Delta\Delta G_D$, ккал/моль	Номер остатка	X	$\Delta\Delta G_D$, ккал/моль	Номер остатка	X	$\Delta\Delta G_D$, ккал/моль
6	Gly	1,2	6	Thr	1,2	13	Ala	3,3
6	Ala	2,1	26	Thr	1,5	17	Ala	2,0
16	Ser	1,7	27	Lys	0,4	24	Phe	0
16	Arg	-0,5	29	Glu	1,8	78	Phe	1,3
26	Gly	1,5				103	Phe	0
26	Ala	1,9						
99	Val	2,7						
105	Val	2,2						

Т а б л и ц а III.5

Изменения свободной энергии разворачивания под действием мочевины белковой цепи барназы при единичной, двойной и тройной заменах аминокислотных остатков

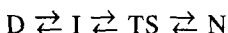
Единичная замена		Двойная замена		Тройная замена	
X→Ala	$\Delta\Delta G_D$, ккал/моль	Ala-Ala	$\Delta\Delta G_D$, ккал/моль	Ala-Ala-Ala	$\Delta\Delta G_D$, ккал/моль
Asp→Ala-8	0,9	Ala-8-Ala-10	0,4	Ala-8-Ala-12-Ala-110	-0,1
Val→Ala-10	3,4	Ala-8-Ala-12	0,8		
Asp→Ala-12	0,3	Ala-12-Ala-110	-0,4		
Arg→Ala-110	0,4				

тиворечат, причем существенно, одному из основных положений метода Фершта о постоянстве вкладов отдельных атомных групп боковых цепей аминокислотных остатков в стабилизацию структуры белка. Отсутствует соответствие даже при тех минимальных изменениях в последовательности, которые автором отнесены к идеальным [110]. Оказалось, что "ненарушающие делеции" Фершта, т.е. переход от объемных алифатических боковых цепей к менее объемным той же природы, не соответствуют своему названию. Аминокислотные замены, подобные Ile и Ala или даже Val, сопровождаются устранением целого ряда невалентных контактов и нарушением существовавшей в локальной области нативной структуры согласованности межостаточных взаимодействий, что, в свою очередь, ведет к повышению энергии поверхностного слоя вокруг образовавшейся "пустоты", самопроизвольной переориентации ближайших боковых цепей, отвечающей изменившимся условиям, и установлению новых невалентных взаимодействий. Поскольку окружение каждого остатка в

трехмерной структуре белка в химическом и пространственном отношении уникально, а также учитывая взаимодействия с молекулами растворителя, то неповторимы и энергетические последствия любых аминокислотных замен. Следовательно, лежащее в основе разработанного Ферштом подхода предположение об отсутствии или незначительности кооперативного эффекта при "ненарушающих де-лечениях", как и других аминокислотных заменах, противоречит собственным экспериментальным данным, касающимся стабильности барназы и многих десятков ее мутантов. Сделанные на этой основе эмпирические оценки энергетическим вкладам отдельных атомных групп белковых цепей в стабильность структуры белка вряд ли можно считать обоснованными.

Перейдем теперь к рассмотрению результатов исследования Фершта и соавт. [138, 139] кинетики свертывания и разворачивания барназы и ее мутантов.

Ранее, при изучении денатурации барназы был сделан вывод, что по ходу своего разворачивания белковая цепь сначала преодолевает переходное состояние, определяющее скорость процесса при всех концентрациях денатуранта (мочевины), а затем последовательно принимает ряд промежуточных форм, из которых идентифицировать удастся лишь одну (1) [131]. Поэтому минимальная кинетическая схема, согласующаяся с существующими опытными данными, имеет вид:



Переходное состояние между I и N, не наблюдаемое экспериментом, авторы представляют флуктуирующим образованием, однако, сохраняющим, некоторые черты исходной нативной структуры (рис. III.21) [130, 137]. Для анализа подобного состояния существует только один подход – кинетический, который и был использован при изучении процесса в направлении разворачивания цепи. Такой выбор имеет то преимущество, что в этом случае процесс начинается с хорошо известной пространственной структуры белка.

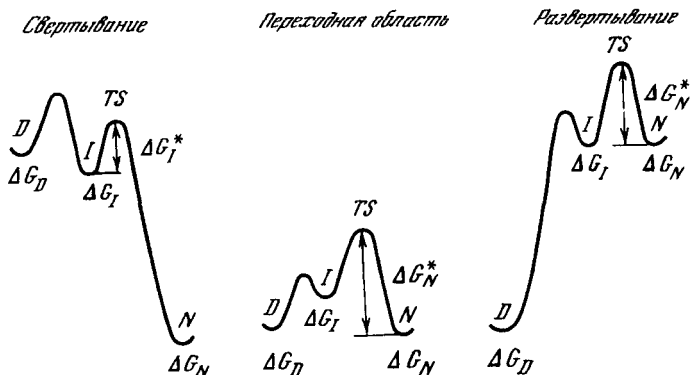
Константа скорости разворачивания (k_D) зависит от концентрации мочевины и, согласно К. Тэнфорду, определяется по формуле:

$$\ln k_D = \ln k_D^{\text{H}_2\text{O}} + m_{KD} \cdot [(H_2N)_2CO],$$

где $k_D^{\text{H}_2\text{O}}$ — константа скорости денатурации в воде, а m_{KD} — эмпирический параметр, характеризующий увеличение экспонированной растворителю поверхности белковой цепи при переходе от полностью свернутой формы к переходному состоянию [151].

Действие мутации на энергию переходного состояния относительно свернутой формы, т.е. энергию активации, $\Delta G_{TS'-N'}$ (рис. III.21), рассчитывается по уравнению Аррениуса, а изменение $\Delta G_{TS'-N'}$ мутанта по сравнению с ΔG_{TS-N} , белка дикого типа, т.е. $\Delta \Delta G_{TS-N}$, находится из соотношения

$$\Delta \Delta G_{TD-N} = -RT \ln(k_D/k'_D),$$



Р и с. III.21. Изменение свободной энергии при свертывании белковой цепи барназы (концентрация мочевины <4 М), развертывании (>4 М) и в состоянии равновесия (4 М)

ΔG_N , ΔG_D , ΔG_I — изменения свободной энергии нативного (N), денатурированного (D) и промежуточного (I) состояний; ΔG^* — энергия активации; TS — переходное состояние [139]

где $\Delta\Delta G_{TS-N}$ — разность изменений энергии активации развертывания нативной барназы и мутантного белка относительно их свернутых форм (N), k_D и k'_D — константы скорости развертывания белка дикого типа и мутанта.

Структурные изменения белковой цепи на пути от нативной конформации до переходного состояния оценивались с помощью параметра ϕ_{TS} , определяемого отношением

$$\phi_{TS} = \frac{\Delta\Delta G_{TS-N}}{\Delta\Delta G_{D-N}},$$

где $\Delta\Delta G_{D-N}$ — разность изменений свободной энергии развертывания белковой цепи, ΔG_{D-N} дикого типа и мутанта, $\Delta G_{D'-N'}$. При справедливости предположения об аддитивности свободной энергии развертывания значение $\phi_{TS} = 0$ ($\phi_{TS} = 1$ при свертывании) указывает на сохранение свернутой формы в месте мутации, а значение $\phi_{TS} = 1$ ($\phi_{TS} = 0$ при свертывании) — на обретение мутированным остатком конформационной свободы полностью развернутой цепи. Любые другие значения параметра ϕ_{TS} , отличные от 0 и 1, могут быть вызваны отклонением от аддитивного представления свободной энергии как простой суммы постоянных вкладов атомных групп, и поэтому в рассматриваемом подходе не имеют однозначной трактовки. Следовательно, при использовании параметра ϕ_{TS} для суждения о структуре переходного состояния ответ может быть получен, строго говоря, только на уровне "или-или". Иными словами, зондирование путем точечных мутаций способно идентифицировать у данного остатка лишь одно из двух конформационных состояний, реализуемых в свернутой (N) и развернутой (D) формах белка.

В работе Фершта и соавт. [138] экспериментально изучены и

детально рассмотрены термодинамические и кинетические данные о денатурации барназы и десятков ее мутантов (в основном единичных). На этой основе были рассчитаны параметры Φ_{TS} для переходного состояния и сделаны заключения о структурных изменениях белковой цепи барназы, происшедшие при ее развертывании на участке $N \rightleftharpoons TS$. Они рассматриваются нами после короткого обсуждения аналогичного материала, полученного для промежуточного состояния (I) на стадии свертывания цепи $D \rightleftharpoons I$ [139]. Изменения свободной энергии состояния I при мутации рассчитывались из констант скорости развертывания (k_D) и свертывания (k_{-D}):

$$\Delta\Delta G_{I-N} = -RT \ln[(k_D^{H_2O}/k_{-D}^{H_2O})/(k_D'^{H_2O}/k_{-D}'^{H_2O})],$$

где $k_D^{H_2O}$, $k_{-D}^{H_2O}$ и $k_D'^{H_2O}$, $k_{-D}'^{H_2O}$ — константы скорости развертывания и свертывания белковой цепи соответственно дикого типа и мутанта в воде. Анализ действия мутантов на промежуточное состояние опирается на параметр Φ_I , значения которого при свертывании цепи рассчитываются по формуле

$$\Phi_I = 1 - (\Delta\Delta G_{I-N} / \Delta\Delta G_{D-N}).$$

В табл. III.6 приведены итоговые результаты всей работы Фершта и сотрудников, посвященной изучению пути свертывания белка с привлечением большого числа мутантов [110, 113, 137—141]. Исключены лишь данные о нескольких параллельных мутациях, не содержащих существенной дополнительной информации. Представленные в табл. III.6 значения Φ_I и Φ_{TS} составляют основу, по существу единственную, на которую могут опираться авторы в своих выводах о последовательности конформационных изменений белковой цепи при ренатурации. Согласно приведенным данным, из 33 исследованных мутантов у четырех в промежуточном состоянии и у семи в переходном значения Φ_I и Φ_{TS} попадают в интервал 0,8—1,0, что указывает на реализацию у остатков в местах мутации конформаций, наблюдаемых в полностью свернутой форме барназы. В 12 случаях значения Φ_I и Φ_{TS} находятся в интервале $-0,1$ — $0,2$, что можно трактовать как сохранение в состояниях I и TS' конформационных возможностей остатков исходной развернутой формы белка (D). У 14 мутантов значения Φ_I и Φ_{TS} колеблются в пределах от 0,2 до 0,8, что не позволяет сделать определенных заключений о происходящих по ходу ренатурации изменениях вблизи мутаций. Обращает на себя внимание и тот факт, что у всех мутантов имеет место почти буквальное совпадение значений Φ_I и Φ_{TS} , а имеющиеся различия, за двумя исключениями, не превышают указанные авторами пределы экспериментальных погрешностей [139]. Из этого можно сделать вывод, который в работе, однако, отсутствует, о практически идентичных, во всяком случае не различаемых используемым методом, конформационных возможностях белковой цепи барназы в промежуточном и переходном

Разности изменений свободной энергии (ккал/моль) промежуточных (I), переходных (TS) и полностью свернутых (N) состояний мутантов относительно денатурированных (D) по сравнению со свободной энергией барназы ($\Delta\Delta G_{D-I}$, $\Delta\Delta G_{D-TS}$, $\Delta\Delta G_{D-N}$) и значения структурных параметров Φ_I и Φ_{TS} при разворачивании белковой цепи [139]

Место мутации	Элемент вторичной структуры	$\Delta\Delta G_{D-I}$	$\Delta\Delta G_{D-TS}$	$\Delta\Delta G_{D-N}$	Φ_I	Φ_{TS}
Ile→Val-4	N-Конец	0	0	0,7	0	0
Asn→Ala-5	»	0,2	0,2	2,1	0	0,1
Thr→Ala-6	α -Спираль	0,7	0,7	2,3	0,3	0,3
Val→Ala-10	»	1,0	1,3	3,6	0,3	0,3
Tyr→Ala-13	»	1,5	1,9	3,7	0,4	0,5
Ala→13/Ala-17	»	1,5	2,0	4,6	0,3	0,4
Leu→Ala-14	»	2,4	2,8	4,5	0,5	0,6
Thr→Ser-16	»	1,3	1,5	1,7	0,8	0,9
Tyr→Ala-17	»	1,0	1,3	2,3	0,5	0,6
<u>His→Gln-18</u>	»	1,2	1,2	1,4	<u>0,8</u>	<u>0,9</u>
Asn→Ala-23	Ω_1 -Петля	0	-0,1	2,5	0	0
Ile→Val-25	»	-0,3	-0,3	1,2	-0,2	-0,2
Thr→Ala-26	»	0	0	2,0	0	0
Glu→Gly-29	α_2 -Спираль	-0,2	-0,2	1,9	-0,1	-0,1
Val→Ala-36	Ω_2 -Петля	-0,3	-0,1	1,3	-0,2	-0,1
Asn→Asp-41	α_3 -Спираль	0	-0,1	2,5	0	0
Val→Ala-45	»	-0,5	-0,3	1,8	-0,3	-0,2
Ile→Val-51	β_1 -Структура	-0,3	-0,3	1,8	-0,1	-0,1
Asp→Ala-54	»	-0,5	-0,5	3,1	-0,2	-0,2
Ile→Ala-55	»	0,7	0,8	1,3	0,5	0,6
<u>Asn→Ala-58</u>	Ω_3 -петля	1,9	2,0	2,2	<u>0,9</u>	<u>0,9</u>
<u>Lys→Arg-62</u>	»	0,3	0,4	0,4	<u>0,8</u>	<u>0,9</u>
Ile→Val-76	β_2 -Структура	-0,1	0	0,9	0	0
Asn→Ala-77	Ω_4 -Петля	0	0	1,9	0	0
Tyr→Phe-78	»	0,2	0,2	1,4	0,1	0,1
Asn→Ala-84	»	0,4	0,3	2,2	0,2	0,1
<u>Ile→Val-88</u>	β_3 -Структура	0,9	1,3	1,4	0,7	<u>0,9</u>
Leu→Val-89	»	0,1	0	0	0,5	0,1
Ser→Ala-91	»	1,1	1,8	1,9	0,7	0,9
Ser→Ala-92	β_2 -Изгиб	1,7	2,6	2,7	0,6	1,0
Ile→Val-96	β_4 -Структура	0,6	0,5	0,9	0,6	0,6
Thr→Val-105	β_5 -Структура	0,7	1,1	2,2	0,3	0,5
Ile→Val-109	C-Конец	0,1	0,1	0,8	0,2	0,2

Примечание. Выделены аминокислотные остатки, конформации которых в промежуточном (I) и переходном (TS) состояниях близки конформациям в свернутой структуре барназы.

состояниях. Используя представленные в табл. III.6 данные, Фершт и сотрудники следующим образом описывают порядок структурирования белковой цепи барназы по ходу ее свертывания.

1. Укладка цепи начинается в промежуточном состоянии (I) и усиливается в переходном (TS) путем формирования главной гидрофобной нуклеации Nucl₁. Из 13 образующих Nucl₁ гидрофобных остатков у шести (Val-10, Leu-14, Ile-76, Ile-88, Ile-96, Ile-109) были опробованы конформационные состояния путем исследования соответствующих мутантов с "ненарушающими делециями". Оказалось, что конформации остатков Ile-76, Ile-109 отвечают развернутой форме ($\phi_1, \phi_{TS} = 0, 0; 0,2, 0,2$), Val-10, Leu-14 и Ile-96 — неопределенному состоянию ($\phi_1, \phi_{TS} = 0,3, 0,3; 0,5, 0,6$ и $0,6, 0,6$) и лишь у одного остатка, Ile-88, конформации в промежуточном ($\phi_1 = 0,7$) и переходном ($\phi_{TS} = 0,9$) состояниях в той или иной мере могут соответствовать конформации в свернутой структуре белка (N). Таким образом, непосредственные результаты исследования не дают достаточных оснований для сделанного в работе заключения о раннем формировании Nucl₁ [139].

2. Далее, авторы утверждают, что нуклеация Nucl₃ начинает образовываться в промежуточном состоянии, а в переходном уже представляет собой компактную структуру [139]. Этот вывод не только не подтверждается, а прямо противоречит имеющимся результатам исследований, представленным в табл. III.6 [138, 139]. Из семи остатков, входящих в Nucl₃, значения ϕ_1 и ϕ_{TS} получены только для одного Leu-89. Но и они ($\phi_1 = 0,5, \phi_{TS} = 0,1$) скорее свидетельствуют не о денатурации конформационного состояния остатка, а об обретении им по ходу укладки белковой цепи большей свободы, что представляется маловероятным.

3. В работе [139] говорится, что нуклеация Nucl₂ не формируется вплоть до переходного состояния. Действительно, рассчитанные для четырех мутантов из восьми, входящих в Nucl₂, значения ϕ_1 и $\phi_{TS'}$, попадают в интервал $-0,3—0,1$, что свидетельствует о конформационной свободе остатков Ile-25, Val-45, Ile-51 и Tyr-78 в состояниях I и TS', такой же, как у белковой цепи в состоянии D.

4. О поведении в процессе свертывания белковой цепи нерегулярных вторичных структур $\Omega_1—\Omega_5$ авторы [139] дают следующее заключение. Петли Ω_2, Ω_4 и части петель Ω_1, Ω_5 остаются развернутыми вплоть до переходного состояния и лишь петля Ω_3 приобретает детерминированную форму. Приведенные в табл. III.6 данные не противоречат сделанному выводу, хотя их так мало, что нельзя быть уверенным в его справедливости. Анализ мутантов с единичными заменами трех остатков в петле Ω_1 , одного — в петле Ω_2 и трех — в Ω_4 , действительно, указывает на развернутое состояние белковой цепи в местах мутаций, а с заменами двух остатков в петле Ω_3 — на свернутое состояние. Данные же о петле Ω_5 в работе отсутствуют.

5. Элементы β -структурной системы начинают образовываться на стадии промежуточного состояния и при подходе к переходному

состоянию приобретают заверченный вид. Вывод не подтверждается результатами их собственного исследования. Имеющиеся данные говорят об обратном. Из пяти β -складчатых листов трехмерной структуры барназы, четыре, а именно: β_1 , β_2 , β_4 и β_5 , не имеют сформировавшихся конформаций в состояниях I и TS. Более того, на этом участке ренатурации у них не обнаруживается и тенденции к структурированию. Только у β_3 -складчатого листа (последовательность 85—91) конформации остатков Ile-88 и Ser-91 приближаются к нативным (в обоих случаях $\phi_1 = 0,7$ и $\phi_{TS} = 0,9$).

6. Свертывание α_1 -спирали начинается с ее С-конца на стадии образования промежуточного состояния и в основном завершается в переходном состоянии. Этот вывод не встречает серьезных возражений, поскольку значения структурных параметров ϕ_1 и ϕ_{TS} у двух С-концевых остатков спирали (Thr-16 и His-18) равны в состоянии I и TS соответственно 0,8 и 0,9.

7. N-Концы α_2 -спирали и всего белка находятся в развернутой форме в состояниях I и TS, а С-конец — в свернутом. Первая часть этого заключения соответствует значениям ϕ_1 и ϕ_{TS} , действительно, отвечающим этой форме (табл. III.6). Что касается конформационного состояния С-конца белка, то, если судить по значениям параметров ϕ_1 и ϕ_{TS} остатка Ile-109, его конформацию следует отнести не к свернутой, как утверждается в работе, а к развернутой [139].

Итак, первая попытка построить на уровне отдельных аминокислотных остатков количественную картину всего пути свертывания белковой цепи не достигла желаемой цели. Декларированный Ферштом и сотрудниками порядок ренатурации барназы не является очевидным следствием беспристрастного анализа, а представляется одним из множества правдоподобных вариантов феноменологического описания процесса. Для такого заключения имеется ряд причин как субъективного, так и объективного характера. Прежде всего, невозможно было дать однозначную трактовку всем этапам свертывания белка из-за ограниченного при решении столь сложной задачи набора структурных параметров ϕ . В самом деле, для описания поведения цепи из 110 аминокислотных остатков авторы ничего не знали о более чем 80% остатков и располагали количественной информацией только о четырех остатках в состоянии I и семи остатках, куда вошли предшествующие четыре, в состоянии TS. Из 33 изученных мутантов лишь у четырех значения параметра ϕ_1 заметно отличаются от ϕ_{TS} . Поэтому трудно говорить определенно о динамике ренатурации белка на участке $I \rightleftharpoons TS$. Метод не фиксирует происходящие здесь события. Очевидно, при таком соотношении числа известных и неизвестных может быть написано много сюжетов укладки барназы.

Набор значений ϕ в принципе может быть увеличен до 110 и выше. Однако, вряд ли это облегчит ситуацию. Нерешенным останется более серьезный вопрос, касающийся заключенной в параметре ϕ струк-

турной информации, т.е. его физического смысла. Выше отмечалось, что строгая трактовка значений ϕ возможна лишь на уровне индивидуальных контактов и при аддитивном представлении энергии взаимодействий боковых цепей. Было показано на материале рассматриваемого исследования, что это нереально даже у мутантов с "ненарушающими делециями". В общем случае нельзя относить всю величину наблюдаемого при аминокислотной замене изменения свободной энергии к боковой цепи одного остатка. Разность свободной энергии белка дикого типа и мутанта (у свернутого состояния — $\Delta\Delta G_N$) непременно содержит в неявном виде энергию переориентации боковых цепей, вызванной мутацией. Найти эту энергию экспериментальным путем не представляется возможным, а к теоретическому подходу Фершт и сотр. относятся скептически¹ [110, 138]. Поэтому найденные параметры ϕ , даже когда они имеют значения вблизи 0 и 1, несут в себе неопределенность, которая в той или иной мере (в какой — неизвестно, но каждый раз — в разной) обесценивает предпринятые усилия.

Глава 14

СВЕРТЫВАНИЕ БЕЛКОВ В КЛЕТКЕ

Рибосомный синтез белка заключается в росте полипептидной цепи путем последовательного присоединения очередной аминокислоты к карбоксильной группе предшествующего остатка. Отдельный цикл элонгации включает три этапа: связывание аминоацил-тРНК, образование пептидной связи и транслокацию рибосомы — перемещение ее вдоль молекулы мРНК в направлении $5' \rightarrow 3'$ от одного кодона к другому. И так до встречи с одним из трех стоп-кодонов. Рост белковой цепи заканчивается присоединением к стоп-кодону фактора освобождения, останавливающего трансляцию и вызывающего отделение законченного полипептида от рибосомы. До этого растущий С-конец последовательности все время остается ковалентно фиксированным в пептидилтрансферазном центре, а N-конец — свободным. При отсутствии каких-либо регуляторных воздействий на биосинтез белка скорость считывания мРНК может достигать у прокариот около 50 нуклеотидов в секунду, а эукариот — около 30 [152]. Следовательно, элонгация белковой цепи небольших размеров продолжается не менее 10—30 с. За это время совершается множество конформационных изменений растущего пептида, поскольку единичное изменение — поворот атомной группы вокруг одинарной связи, занимает всего 10^{-12} — 10^{-14} с.

Таким образом, в условиях *in vivo*, в отличие от спонтанной ренатурации развернутой цепи в опытах *in vitro*, процессы химической и

¹ Вопрос о том, насколько такое отношение оправдано, рассматривается в следующем томе этого издания.

пространственной структурной организации белковой молекулы могут идти параллельно и заканчиваться практически одновременно. В этом случае нельзя исключить котрансляционное свертывание полипептидной цепи в нативную трехмерную структуру и обретение белком, еще прикрепленном к рибосоме, биологической активности. Предположение о возможной укладке белковой цепи в нативную конформацию во время ее синтеза *in vivo* нашло подтверждение в большом числе экспериментальных исследований. Классическим примером является β -галактозидаза, гидролизующая лактозу до глюкозы и галактозы. Для проявления своей активности фермент требует не только определенной структурной организации отдельной макромолекулы, но и формирования из четырех субъединиц специфического четвертичного комплекса [152]. Тем не менее, было обнаружено, что растущая, т.е. еще связанная с рибосомой, полипептидная цепь ферментов способна взаимодействовать с находящимися в растворе свободными субъединицами и образовывать четвертичную структуру, обладающую β -галактозидазной активностью. До завершения трансляции мРНК и освобождения от рибосомы полипептидная цепь этого же фермента также реагирует на антитела третичной структуры, т.е. обнаруживает иммунологическую специфичность зрелого белка [153].

Свертывание белка по ходу его рибосомного синтеза, направленного от N-конца молекулы к ее C-концу, происходит при переменной длине цепи и меняющихся внешних условиях. В начале процесса, когда длина растущего полипептида не достигает 30—40 аминокислотных остатков, синтезированный участок находится внутри рибосомы и не контактирует с внешней средой; его конформационное состояние определяется аминокислотной последовательностью и рибосомным окружением. После того, как длина нарождающейся белковой цепи превысит 30—40 остатков, свободная N-концевая часть полипептида оказывается за пределами "родительского дома" и на ее свертывание начинает воздействовать новый внешний фактор — среда, окружающая рибосому. Следовательно, при биосинтезе и одновременной сборке нативной конформации белка каждый участок аминокислотной последовательности, удаляясь от пептидилтрансферазного центра, проходит как бы две стадии обработки — первичную (в рибосоме), очевидно, препятствующую образованию непродуктивных контактов между остатками растущего полипептида, и вторичную (вне рибосомы), необходимую для сборки нативной конформации. Коль скоро свертывание белковой цепи *in vitro* в рибосомах не нуждается, но в то же время чувствительно к природе растворителя, величинам pH, ионной силы и т.д., есть основания полагать, что внутририбосомная обработка является вспомогательной операцией, не определяющей свертывание цепи, а лишь облегчающей и ускоряющей его. Главную же роль в организации физиологически активной пространственной структуры белка играют внерибосомные внутримолекулярные и межмолекулярные взаимодействия.

Окружающая среда, в которой оказываются белки во время и сразу после окончания трансляции, зависит от локализации ведущих

белковый синтез рибосом, организованных в полирибосомы. Одна часть рибосом находится в свободном состоянии, другая — прикреплена к мембранам эндоплазматического ретикулула. Свободные рибосомы размещены в цитозоле, не занятом органеллами пространстве, и в матриксе митохондрий или, в случае растений и хлоропластов — концентрированном растворе различных ферментов. Котрансляционное и посттрансляционное свертывание белковой цепи в этих компартментах происходит в водной среде. Здесь синтезируются белки главным образом для внутренних нужд, а поэтому эмбриональные, недифференцированные и быстро растущие и размножающиеся клетки содержат преимущественно свободные рибосомы.

Связанные рибосомы расположены на обращенной к цитоплазме стороне одиночной мембраны шероховатого, эндоплазматического ретикулула и также одиночной наружной мембраны ядерной оболочки. В этом случае внерибосомное свертывание полипептидной цепи осуществляется в условиях преимущественно гидрофобного окружения фосфолипидного слоя мембраны. Рибосомы, ассоциированные с эндоплазматическим ретикулулом и ядерной оболочкой, синтезируют белки для мембран, других органелл и секреторные белки, выделяемые через мембранные просветы на поверхность эпителия или во внутреннюю среду организма.

Таким образом, сборка трехмерных структур белковых молекул и образование гомо- и гетерогенных олигомерных белковых комплексов происходят в разных условиях в зависимости от локализации и состояния рибосом, клеточных компартментов, в которых осуществляется рибосомный синтез, и типа клетки. Очевидно, они не совсем одинаковы у прокариот и эукариот. В еще большей мере условия *in vivo* могут отличаться от условий ренатурации развернутой белковой цепи *in vitro*. Между тем, свертывание полипептида в процессе биосинтеза и в искусственных условиях во многих случаях приводит к идентичным пространственным структурам.

Классические исследования, свидетельствующие о возможности восстановления физиологически активной конформации белковой молекулы, были проведены еще в первые десятилетия XX в. Л. Михаэлисом, М. Ансоном, А. Мирским, Г. Нейратом, Ф. Гауровицем, Л. Полингом и др. [154]. В 1945 г. Ансон постулировал обратимость реакции денатурации—ренатурации белков [155].

Бесспорные экспериментальные данные о полной реставрации активной трехмерной структуры белка после его денатурации, т.е. разрушения всех элементов нативной конформации и разрыва дисульфидных связей, получены в 1961 г. К. Анфинсеном и сотрудниками при изучении рибонуклеазы А. Было доказано, что развернутая полипептидная цепь фермента с восстановленными сульфгидрильными группами остатков Cys вновь самопроизвольно свертывается после удаления денатурирующего агента, принимая конформацию, неотличимую от чисто природного объекта в отношении системы дисульфидных связей и каталитической активности. Такой же результат Анфинсен и соавт. [156, 157] позднее получили при изучении обратимой денатурации

стафилококковой нуклеазы и миоглобина. Во всех случаях белки полностью ренатурировали свои пространственные формы в пробирке и, следовательно, процесс определялся исключительно аминокислотными последовательностями. К. Анфинсеном была сформулирована так называемая термодинамическая гипотеза, согласно которой процесс структурной самоорганизации белковой молекулы подчиняется свободной энергии Гиббса, а поэтому нативная конформация белка обладает минимальной энергией, т.е. является глобальной [2]. Отсюда следовал фундаментальный вывод о том, что вся информация, необходимая для сборки окончательной структуры белка, заключена в его аминокислотной последовательности. Иными словами, вновь синтезируемый полипептид обретает свою физиологически активную конформацию во внутриклеточном окружении без помощи других молекул и без затраты энергии, т.е. спонтанно. К аналогичным заключениям вскоре пришли М. Перутц, Дж. Кендрью и др. [158, 159].

Термодинамическая гипотеза, правда в чисто феноменологическом плане, впервые была сформулирована в 1954 г. Р. Ламри и Г. Эйрингом [1]. А год спустя принцип самоорганизации невалентных комплексов белков между собой и с другими макромолекулами был провозглашен Г. Фраенкель-Конратом и Р. Уиллиамсом, обнаружившим самопроизвольное реконструирование инфекционного вируса табачной мозаики при инкубации его неактивных белковых и нуклеиновых компонентов.

Ф. Рихардс в 1958 г. открыл хорошо известные сейчас рекомбинантные системы, состоящие из нескольких белковых фрагментов, способных спонтанно собираться посредством невалентных взаимодействий в биологически активные структуры, подобные родительским белковым молекулам [160]. Обратимо и без помощи других веществ происходит сборка рибосомных частиц. А.С. Спирин и соавт. [161, 162], М. Номура и соавт. [163, 164], подобрав соответствующие условия, наблюдали полную реконструкцию биологически активных 50S и 30S частиц из изолированных рибосомных РНК и двух наборов из 32 и 21 индивидуального рибосомного белка. При исследовании самосборки частицы 30S Номура и соавт. [165, 166] обнаружили, что процесс начинается с автономной компактизации рРНК из состояния 16S в состояние 22S и образования каркаса для размещения белков. Их последующее присоединение сопровождается четырьмя конформационными переходами из менее компактного в более компактное состояние (22S $\rightarrow$ 23S $\rightarrow$ 25S $\rightarrow$ 28S $\rightarrow$ 30S).

Со временем, по мере развития молекулярной биологии, количество белков, их комплексов друг с другом, нуклеиновыми кислотами, липидами, углеводами и т.д., проявляющих склонность к структурной самоорганизации, постоянно росло. Недавно перечень многочисленных водорастворимых глобулярных белков с хорошо известной способностью к обратимой денатурации впервые пополнился несколькими интегральными мембранными белками, пространственное строение которых также удалось успешно ренатурировать Дж. Попоту и соавт. [167], Т. Серри и Ф. Янигу [168]. Таким образом, становилось все более

очевидно, что присущая белкам склонность к самопроизвольному свертыванию в строго детерминированные трехмерные структуры без помощи других молекул представляет собой фундаментальное качество биологических систем, обуславливающее специфические особенности не только молекулярного уровня, но и последующих уровней иерархической организации живого. Множество примеров свидетельствует, что такие надмолекулярные структуры, как белковые агрегаты, рибосомы, белковые волокна, вирусы и мембраны, не синтезируются в виде единых, ковалентносвязанных гигантских молекул, а собираются в результате невалентной агрегации макромолекулярных субъединиц.

Такой способ построения больших структур имеет ряд очевидных преимуществ. Во-первых, невалентная агрегация одинаковых субъединиц требует меньше генетической информации, а следовательно, меньше генетического материала. Во-вторых, сборка и диссоциация большой структуры, построенной за счет невалентных взаимодействий, легко поддается контролю. В-третьих, сборка структуры из субъединиц позволяет свести к минимуму количество ошибок, поскольку функционирование специального механизма корректирования в процессе сборки может устранить испорченные субъединицы [169, 170].

Для белков утвердились следующие принципы их молекулярной структурной организации: 1) аминокислотная последовательность однозначно определяет нативную конформацию белка; 2) свертывание белковой цепи в нативную конформацию осуществляется спонтанно, т.е. имеется прямая связь, не требующая посредников, между линейным порядком аминокислот и их расположением в пространстве; 3) стабильная в физиологических условиях конформация белка отвечает минимальной свободной энергии Гиббса.

14.1. ФЕРМЕНТЫ, УЧАСТВУЮЩИЕ В СВЕРТЫВАНИИ БЕЛКОВ

Положение о том, что информация о сборке белка заключена в строении самой белковой молекулы, до недавнего времени являлось общепринятым и воспринималось буквально. Менее очевидными представлялись (и все еще остаются таковыми) побудительные мотивы и механизм спонтанного свертывания белковой цепи. Их трактовка обычно исходила из предположения о появлении на ранней стадии ренатурации вторичных структур, считающихся самыми стабильными из всех возможных форм полипептидной цепи, гидрофобном схлопывании и возникновении так называемой расплавленной глобулы, содержащей многие элементы конечной структуры, и образования стабилизирующих нативную конформацию ковалентных и ионных взаимодействий, подобных дисульфидным связям и ионным парам (см. гл. 7 и 12 и обзоры последних лет [18, 108, 171—175]). Однако эти объяснения в значительной мере имели гипотетический характер. Ни одно из них в течение десятилетий не смогло привести к разработке

строгой физической теории и априорному методу расчета геометрии нативной конформации по известной аминокислотной последовательности. Поэтому перечисленные выше принципы пространственной структурной организации оказались постулатами, весьма правдоподобными, однако строго не доказанными.

Белок-дисульфидная изомераза. Х. Динтцис [176], К. Кенфилд и К. Анфинсен [177] впервые обратили внимание на то, что искусственная сборка нативной конформации рибонуклеазы А с ее четырьмя дисульфидными связями продолжается несколько часов, тогда как биосинтез этого же белка и построение функционирующей трехмерной структуры занимает всего несколько минут. В то же время, продолжительность сборки таких же небольших белков, стафилококковой нуклеазы (149 остатков) и миоглобина (153 остатка) составляет в условиях *in vitro* всего несколько секунд, т.е. меньше, чем в процессе рибосомного синтеза [2].

К. Анфинсен предположил существование генетического контроля за свертыванием белковой цепи в процессе биосинтеза, осуществляемого с помощью специфических ферментов ("shuffling enzymes"), катализирующих скорость-лимитирующие стадии сборки, в данном случае, образование S—S-мостиков. Действительно, в его лаборатории вскоре был выделен один из таких ферментов. Аминокислотная последовательность фермента содержала остаток Cys в восстановленной SH-форме, которая участвует в тиол-дисульфидной обменной реакции с синтезируемым белком, ускоряя образование правильной системы дисульфидных связей [178, 179].

Это был первый факт, который свидетельствовал об участии одного белка в сборке трехмерной структуры другого и, следовательно, противоречил (по крайней мере формально) постулатам Ламри и Эйринга и термодинамической гипотезе самого Анфинсена. Долгое время он оставался единственным и практически не замеченным на фоне многочисленных данных о полной ренатурации развернутой белковой цепи *in vitro*, однозначно подтверждавших положение о том, что вся информация о пространственном строении и функции белка заключена в его аминокислотной последовательности. Однако при постоянном увеличивающемся внимании к проблеме структурной организации белковых молекул, всевозрастающем количестве работ в области обратимой денатурации, разработке новых методов анализа промежуточных состояний и поиске подхода к изучению деталей рибосомного синтеза стали все чаще обнаруживаться факты, указывающие на более сложный механизм сборки белка *in vivo*, чем это, на первый взгляд, следовало из опытов *in vitro*. Но и там положение не отличалось большой ясностью. Оказалось, что в искусственных условиях свертывание природных полипептидных цепей не всегда бывает успешным. Лучше всего ренатурируют водорастворимые однодоменные глобулярные белки небольших размеров.

Во многих случаях денатурация не является в полной мере обратимой, особенно при температурах и концентрациях, приближающихся к найденным *in vivo*. В условиях *in vitro* возвращение к

нативной конформации происходит эффективнее при более низких температурах и значительно меньших концентрациях. Неудачами, как правило, заканчивались попытки ренатурировать развернутые цепи сложных белков, имеющих многодоменную структуру и проявляющих свою активность в олигомерных комплексах или при ассоциации с другими макромолекулами. Не поддавались также повторной сборке денатурированные фибриллярные белки соединительных тканей, интегральные мембранные белки и целый ряд других. Отсутствие обратимой денатурации объяснялось, во-первых, уникальными условиями свертывания белковой цепи *in vivo*, малоизвестными и не воспроизводимыми *in vitro*, во-вторых, беспорядочными невалентными взаимодействиями развернутых полипептидных цепей, их коагуляцией и осаждением или, в-третьих, ковалентными модификациями, которым подвергаются белки после отделения от рибосом (известно более сотни типов посттрансляционных химических модификаций).

Качественное изменение ситуации в изучении механизмов свертывания белковых цепей наметилось в самом конце 1980-х годов. Оно вызвано открытием нового класса белковых молекул, существование которых мало кто предполагал, во всяком случае, оно представлялось маловероятным. Их функции в жизнедеятельности клеток заключаются в содействии правильной невалентной сборки других белков, не становясь, однако, компонентами их окончательных физиологически активных структур. Белки этого класса получили название молекулярных шаперонов². Открытие шаперонов вместе с известными ранее, но необобщенными и не привлечшими к себе должного внимания данными поколебало, особенно на первых порах, общепринятую точку зрения на принципы структурной организации белковых молекул. Новые факты неизбежно вели к заключению, что существовавшее представление о свертывании полипептидной цепи *in vivo* как о самосборке белка, по меньшей мере не совсем точно отражает реальный процесс. Необходимость пересмотра устоявшегося мнения о взаимосвязи между химическим и пространственным строением белковых молекул диктовалась новыми экспериментальными данными, число которых начинает возрастать лавинообразно. Все они свидетельствовали об уменьшении выхода, замедлении скорости и даже полном прекращении сборки трехмерных структур одних белков по мере снижения вблизи рибосом концентрации других белков. Стали известны две группы молекулярных посредников, функции которых в клеточной сборке белковых цепей оказались значительными и разнообразными. Они влияют на скорость свертывания цепи, целенаправленно ускоряя или замедляя созревание нативной конформации, определяют порядок формообразования сложных комплексов, стимулируя реорганизацию белок-белковых взаимодействий в олигомерных структурах, облегчают деградацию неправильно свернутых цепей, стабилизируют, транспортируют и соединяют в соответствующих клеточных компартментах

² Шаперон (chaperon) — в переводе с английского означает пожилую даму, которая оберегает юную леди при ее выходе в свет.

компоненты макромолекулярных агрегатов, предотвращая несвернутые или частично свернутые полипептиды от случайных, непродуктивных взаимодействий.

Белки одной группы посредников — это ферменты, катализирующие сборку полипептидной цепи путем образования с ней ковалентных промежуточных комплексов, что сокращает продолжительность случайно-поискового механизма процессов пространственной организации белковых молекул. Белки второй группы — молекулярные шапероны. В принципе они также подпадают под определение ферментов, поскольку влияют лишь на скорость структурной организации белковой цепи, предохраняя ее от неправильных внутримолекулярных и межмолекулярных контактов. Различие в том, что шапероны, во всяком случае уже известные, реализуют свои многочисленные функции только за счет невалентных контактов со свертывающимся белком, не вступая с ним в химические взаимодействия.

В посредническую группу ферментов входят белок-дисульфидная изомераза, впервые обнаруженная К. Анфинсеном и соавт. [178, 179], и пептидилпролил-*цис-транс*-изомераза, выделенная Дж. Эдманом, Л. Эллисом и Р. Блэнчером [180]. Они катализируют скорость-определяющие стадии сборки белковой цепи *in vivo* — тиол-дисульфидную обменную реакцию и изомеризацию пептидной связи, предшествующей остатку пролина ($X-Pr$, где X — любой аминокислотный остаток последовательности) [181]. Оба фермента не определяют путь свертывания полипептидной цепи, а лишь ускоряют создание правильной системы дисульфидных связей, в первом случае, и требуемых конфигураций пептидных связей, во втором, способствуя быстрой перегруппировке $S-S$ -мостиков из *цис*-конфигураций в *транс*-у дипептидов $X-Pr$, которые не отвечают нативной конформации белка. Оба фермента, выделенные из клеток и очищенные, выполняют те же функции в условиях *in vitro* [174, 179, 182—184].

Белок-дисульфидная изомераза в значительном количестве присутствует в эндоплазматических ретикулах различных типов клеток эукариот. Ее активность хорошо коррелирует с уровнем синтеза секреторных белков [185]. Химические перекрестные модификации фермента свидетельствуют об избирательности его взаимодействий с синтезируемыми на рибосомах в эндоплазматическом ретикуле полипептидными цепями иммуноглобулинов [186]. Введение очищенной изомеразы в микросомы, предварительно освобожденные от нее щелочной или детергентной обработкой, вновь восстанавливает котрансляционное образование дисульфидных связей при внеклеточном рибосомном синтезе белковой цепи [184].

Белок-дисульфидная изомераза клеток млекопитающих проявляет активность в форме димера идентичных субъединиц молекулярной массы около 57 кДа [180]. Пространственная структура отдельной молекулы состоит из двух доменов, каждый из которых обнаруживает близкую гомологию с тиоредоксином [187], — небольшим белком с молекулярной массой 12 кДа, присутствующим во всех живых

Ферменты, участвующие в сборке нативной конформации белка [193]

Источник		Белок- дисульфидная изомераза (PDI)	Пептидилпролил- <i>цис</i> -транс- изомераза (PPI)	
Организм	Органелла		Cph-PPI	FKBP-PPI
E. coli	Цитозоль Периплазма Цитозоль	Тиоредоксин	Ротамаза b Ротамаза a Cph1p(Cpr1p)	Fkb1p(Fkr1p) (Rbp1p)
Дрожжи	Эндоплазматический ретикулум	PDI Eug1p	yCyPB	
Дрозофила	Цитозоль		CyP Циклофилин	FKBR
Млекопитающие	»		(PPIase) (CyPA)	
	Эндоплазматический ретикулум	PDI(ERp59) GSBP ERp72 ERp61 PDI	CyPB(rCyPLP)	
Растения	Хлоропласты			

организмах, от бактерий до высших эукариот [188] (табл. III.7). Тиоредоксин обладает окислительно-восстановительным (редокс) потенциалом, способствующим образованию, изомеризации и разрушению дисульфидных связей. На основе изученного пространственного строения его была построена модель функционирующего димера белок-дисульфидной изомеразы [187]. Она включает четыре подобные тиоредоксину домена, дитиол-дисульфидные активные центры которых расположены на поверхности комплекса. Исследования Р. Нойва и У. Леннарса [189] показали, что образование S—S-мостиков в клеточной и бесклеточной системах происходит практически сразу же после проникновения фермента в канальца эндоплазматического ретикулума или внутрь микросомы и продолжается одновременно с рибосомным синтезом белка.

Назначение белок-дисульфидной изомеразы не сводится только к сокращению времени сборки белковой цепи путем быстрого разрушения неправильных дисульфидных связей и восстановления сульфгидрильных групп. В своей гомодимерной форме (β_2) она входит в тетрамерный комплекс $\alpha_2\beta_2$ пролил-4-гидроксилазы, катализирующей известную модификацию боковых цепей остатков пролина в синтезируемых аминокислотных последовательностях коллагена [190].

Белок-дисульфидная изомераза является также составной частью гликозидазы [191] и триглицеридтрансферазы [192]. Кроме того, в эндоплазматическом ретикулуле обнаружен ряд других белков (ERp59, ERp61, ERp72), содержащих гомологичные тиоредоксину субъединицы. Их функции еще не вполне ясны.

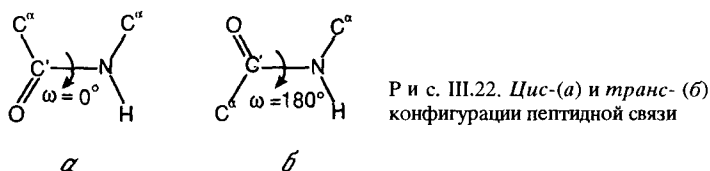
Таким образом, эндоплазматический ретикулум содержит, помимо белок-дисульфидной изомеразы, целое семейство многопрофильных ферментов, в которые входят тиоредоксиноподобные структуры с дитиолдисульфидными активными центрами. Все ли они обладают окислительно-восстановительным потенциалом и принимают участие в котрансляционной и посттрансляционной сборке белковой цепи или только катализируют различные модификации секреторных белков пока неизвестно.

Пептидилпролил-*цис-транс*-изомераза. Пептидные связи в белках и ненапряженных циклах обычно планарны и реализуются в двух энергетически предпочтительных ротамерных формах, получивших название *цис*-и *транс*-конфигураций (рис. III.22). Барьеры вращения вокруг связей C'—N в свободных молекулах атомов составляют 15—20 ккал/моль, а разность энергии, ΔH_{180-0° , — на порядок меньше в пользу *транс*-конфигурации. Наблюдаемые различия в энергии форм не могут быть объяснены суммарным эффектом невалентных ван-дер-ваальсовых и электростатических взаимодействий [194]. Необходимо предположение о неодинаковом электронном строении двух конфигураций, незначительном в масштабе энергии связей, но существенном в установлении той или иной формы. По приближенной оценке, величина валентного вклада в стабилизацию более выгодной *транс*-формы составляет 1,0—2,0 ккал/моль. Отклонение от аддитивности в распределении электронной плотности связей, образуемых азотом пептидной группы, объясняет доминирование у N-алкилформамидов *транс*-конфигурации, уступающей альтернативной форме по энергии невалентных взаимодействий. На небольшое различие в электронных свойствах связей амидного азота и *транс*- и *цис*-конфигурациях C—N-связи указывают некоторые опытные факты, например, неэквивалентность длин связей и дипольных моментов NH, валентных углов HNC аминокруппы формамида [195, 196].

На формирование пространственного строения полипептидов и белков оказывают воздействие не только различие в энергии конфигураций отдельных пептидных связей, но и кооперативные конформационные эффекты и влияние растворителя. В принципе не исключены ситуации, когда даже небольшой предпочтительности в энергии одной из форм окажется достаточно для реализации структуры всего полипептида. Или, напротив, исходя из общей энергии молекулы, оптимальной может стать конфигурация пептидной связи, имеющая несколько большую (в изолированном состоянии) величину энтальпии. Например, поли-*L*-пролин в неполярных средах содержит пептидные группы в *цис*-форме (полипролин I), а в полярных — *транс*-форме (полипролин II). В тех же условиях у его ближайшего конформацион-

ного аналога поли-N-метил-L-аланина пептидные группы реализуются только в *транс*-форме. Согласно результатам теоретического анализа, разность в энергии *цис*- и *транс*-полипролина невелика (0—1,5 ккал/моль в пользу последнего) и, как показывает эксперимент, может перекрываться влиянием растворителя [197].

Транс-конфигурация пептидной связи в белках, как правило, выгоднее *цис*- и в электронном, и конформационном отношении. При *цис*-конфигурации связи C'—N неблагоприятные контакты могут возникнуть между атомами C^α и боковыми цепями смежных остатков

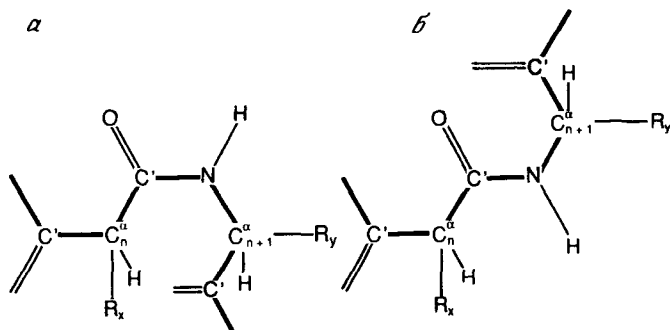


Р и с. III.22. *Цис*-(а) и *транс*-(б) конфигурации пептидной связи

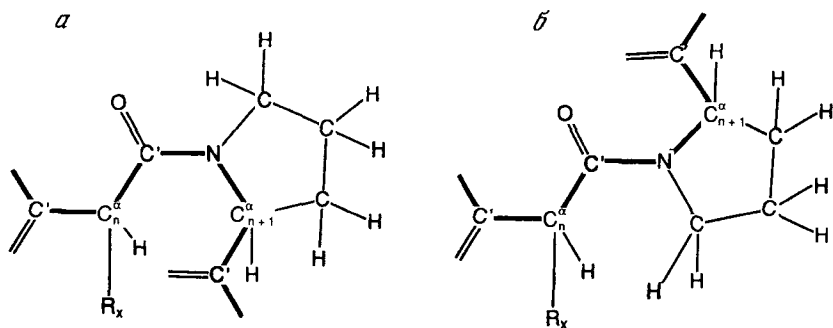
(рис. III.23). Поэтому она, согласно данным Т. Крейтона, встречается более чем в 10^3 раз реже *транс*-конфигурации связи [197]. Если же последующим остатком в аминокислотной последовательности является Pro (рис. III.24), то величины свободной энергии двух форм пептидной связи практически выравниваются и вероятность реализации *транс*-конфигурации превышает *цис*- всего лишь в четыре раза. Следовательно, наличие в трехмерных структурах белков *цис*-пептидных связей, особенно на участках X—Pro, не должно представляться чрезвычайным по своей исключительности событием [198, 199].

При свертывании белка в условиях *in vitro* неизбежно возникновение ситуации, когда одна часть свертываемых цепей будет иметь пептидные связи в конфигурациях, отвечающих правильной нативной конформации, а другая — нет. Дж. Брандтс и соавт. [200] показали, что *цис-транс*-изомеризация пептидной связи вблизи пролина является медленным процессом. Полупериод его составляет 20 мин при 0° и уменьшается в ~ 3,3 раза при увеличении температуры на каждые 10°. В связи с этим в искусственных условиях белковые цепи свертываются тем дольше, чем больше в их последовательностях остатков Pro [201]. В некоторых случаях ренатурация приводит к окончательной нативной конформации с неправильными конфигурациями отдельных пролиновых пептидных связей [202].

Ф. Шмид и соавт. [203] при исследовании ренатурации рибонуклеазы А, содержащей четыре остатка Pro, из которых два имеют в нативной трехмерной структуре *цис*-конфигурацию, обнаружили в процессе свертывания три различные кинетические фазы. Одна из них относилась к 15% молекул, которые свертывались за миллисекунды, другая (65%) — за секунды и третья (20%) — еще медленнее. Предположено, что различие в скоростях сборки связано с *цис-транс*-изомеризацией пептидных связей. Полипептидные цепи первой группы



Р и с. III.23. *Цис*- (а) и *транс*- (б) конфигурации пептидной связи фрагмента R_x-R_y (R_x, R_y — любые аминокислотные остатки за исключением Pro)



Р и с. III.24. *Цис*- (а) и *транс*- (б) конфигурации пептидной связи фрагмента R_x -Pro (R_x — любой аминокислотный остаток)

имели правильные конфигурации, а второй и третьей — неправильные. Замены остатков Pro в аминокислотных последовательностях белков на другие остатки в большинстве случаев увеличивают скорость сборки *in vitro*. Однако часто процесс осложняется и не приводит к нативной конформации белка дикого типа из-за дестабилизирующего эффекта *цис*-формы, особенно невыгодной без Pro [204, 205].

Из сопоставления продолжительности и эффективности свертывания белковой цепи в условиях *in vivo* и *in vitro*, а также независимости скорости клеточной сборки полипептида от содержания в аминокислотной последовательности остатков Pro напрашивался вывод об участии в формировании трехмерной структуры белка в процессе его биосинтеза соответствующих ферментов. Наиболее вероятно, их функция должна заключаться в специфической и быстрой конформационной изомеризации *транс*-формы, которую имеют все пептидные связи белковой цепи при выходе из пептидилтрансферазного центра рибосомы, в *цис*-форму. Следовательно, можно было ожидать, что

предполагаемые ферменты будут действовать как конформазы и являются прежде всего пептидилпролил-*цис-транс*-изомеразами. Действительно, Г. Фишером и соавт. [182] в 1987 г. были обнаружены ферменты, катализирующие медленную изомеризацию пептидных связей на участках X—Pro. Они присутствуют в больших количествах практически во всех тканях и организмах, от бактерий до млекопитающих, и проявляют пептидилпролил-*цис-транс*-изомеразную активность как *in vitro* [174, 182, 183], так и *in vivo* [181, 206, 207]. Ферменты принадлежат двум, структурно совершенно различным семействам (табл. III.7). Белки одного из них, получившие название циклофилинсвязывающие, обнаруживают у эукариот, помимо *цис-транс*-изомеразной активности, высокое сродство к циклоспорину А. Белки другого семейства, так называемые FKBP-связывающие, образуют комплексы с веществом FK506 и рапамицином. Наличие взаимосвязи между пептидилпролил-*цис-транс*-изомеразной и иммуносупрессорной активностями пока остается невыясненной. С. Шрейбер полагает, что белки этих семейств обладают способностью связывать лекарственные препараты, представляющие собой циклические пептиды, и реорганизовывать их структуры в физиологически активные конформации, что, по-видимому, требует *цис-транс*-изомеризации пролиновых пептидных связей [208]. Циклофилин- и FKBP-связывающие белки обнаруживают, как показали М. Стэммс и соавт. [207], существенное различие в субстратной специфичности. Первые слабоспецифичны и не распознают аминокислотный остаток X в фрагменте X—Pro. FKBP-белки более специфичны, предпочитая в этом положении гидрофобные остатки. Предполагается, что обладающие пептидилпролил-*цис-транс*-изомеразной активностью белки обоих семейств имеют в принципе одинаковый механизм действия, суть которого заключается в принудительной невалентной деформации пептидной связи и стабилизации ее в активном центре фермента в переходном высокоэнергетическом состоянии ($\omega \sim 90^\circ$) [208].

14.2. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ШАПЕРОНЫ

Белок-дисульфидные изомеразы и пептидилпролил-*цис-транс*-изомеразы, конечно, не являются единственными ферментами, принимающими участие в свертывании белка. Провести четкую грань между ними и другими ферментами, оказывающими то или иное воздействие на пространственное строение окончательной физиологически активной конформации белковой молекулы, по-видимому, трудно. Существует множество ферментов, ковалентно модифицирующих сходящие с рибосом полипептидные цепи и, следовательно, изменяющие их трехмерные структуры (гидролазы, трансферазы, липазы, лигазы и др.). Исключительность в этом отношении каталитического действия рассмотренных изомераз можно увидеть в том, что они только содействуют внутримолекулярным перестройкам, ускоряющим сборку белка, не затрагивая самой аминокислотной последовательности.

В принципе такую же вспомогательную роль, но с помощью невалентных взаимодействий (в отличие от изомераз), играет в структурной организации синтезируемых *in vivo* белков еще один класс молекулярных посредников — шаперонов, обнаруженных, как уже отмечалось, недавно во многих клеточных компартментах. Впервые новый термин появился в литературе в 1978 г. в работе Р. Ласки и соавт. [209], посвященной изучению механизма внеклеточной сборки нуклеосомы, состоящей из октамерного гистонового кодра и уложенных вокруг него нескольких витков двухспиральной ДНК. Исследователи показали, что образование правильной структуры ДНК-гистонового комплекса происходит только в присутствии еще одного белка, не являющегося их компонентом, — нуклеоплазмина, который и был назван шапероном. Такое название, как полагали авторы, адекватно отражало выполняемую белком функцию, состоящую в предохранении гистонов от ошибочных контактов с ДНК во время нуклеосомной сборки.

Годом позже аналогичная посредническая функция была приписана Р. Эллизом и соавт. [210, 211] белку, временное участие которого, по их предположению, необходимо для правильной сборки олигомерного голофермента рубиско (рибулозобифосфат-карбоксилазы-оксигеназы), синтезируемого в хлоропластах высших растений. Было установлено, что присутствующий в избытке белок не входит в состав зрелого фермента, а образует промежуточный невалентный комплекс с большой субъединицей рубиско перед ее ассоциацией с другими субъединицами.

К мысли о существовании белков, предотвращающих беспорядочную коагуляцию полипептидных цепей в процессе сборки сложных макромолекулярных конгломератов, пришел также Р. Гендрикс [212], исследуя формообразование бактериофагов λ , T4 и T5 в мутированной по гену Gро E клетке E. coli.

Появление отмеченных выше работ не вызвало вначале заметного резонанса в среде молекулярных биологов и не поколебало их веру в существование спонтанной, не нуждающейся ни в каких посредниках, самоорганизации пространственного строения аминокислотных последовательностей и белковых агрегатов. Новые факты о ранее неизвестных функциях некоторых белков и необычном механизме сборки воспринимались, в лучшем случае, как исключения, нуждающиеся в дальнейшем изучении и подтверждении. Впервые Г. Пелхэм увидел за этими немногочисленными и разрозненными фактами необходимое для жизнедеятельности клетки явление, как потом оказалось, чрезвычайно распространенное [213]. Он пришел к выводу о существовании в клетках животных, растений и микроорганизмов специальных белков, функция которых состоит в помощи сборке и разборке полипептидных цепей и их комплексов.

К более широкому обобщению пришел в 1987 г. Р. Эллис, который сначала продолжил, а вскоре собственными экспериментальными исследованиями доказал существование в клетках нескольких различных семейств белков, участвующих в качестве посредников в

свертывании полипептидных цепей и сборке более сложных структур [214—219]. Р. Эллис назвал их молекулярными шаперонами. Так, спустя десять лет, в литературе вновь возникло это понятие, правда, теперь уже относящееся к функциональным свойствам не одной белковой молекулы (нуклеоплазмина), а целого класса белков.

Участие посторонних белков в сборке, как оказалось, не соответствует традиционному представлению о наличии прямой аналогии между механизмами свертывания полипептидных цепей в искусственных условиях и клетке. Ставшие известными функции молекулярных шаперонов потребовали определенной коррекции давно сформулированного и многократно подтвержденного в опытах *in vitro* принципа не нуждающейся в каких-либо посредниках самосборки белка. Выяснилось, что это не совсем так. Более того, оказалось, что в сложных клеточных условиях нужны белки, ассистирующие не только котрансляционное и посттрансляционное свертывание полипептидных цепей, но и помогающие транспорту белковых молекул через мембраны, реорганизации, диссоциации и ассоциации белков в олигомерные комплексы, сборке олигомеров внутри органелл и ликвидации белковых повреждений, вызванных стрессовыми и иными внешними воздействиями.

Молекулярные шапероны Эллис трактует "...как функциональный класс несвязанных между собой семейств белков, которые помогают правильной невалентной сборке других полипептидсодержащих структур *in vivo*, но не входят в состав собираемых структур и не участвуют в реализации их нормальных физиологических функций" [220. С. 258]. Отсюда следует, что к классу шаперонов может быть отнесен белок, который обеспечивает быструю и правильную сборку трехмерной структуры другого белка или ансамбля белков, не являясь, однако, компонентом этой структуры. Шаперон не несет специфической информации о механизме процесса, его направленности и конечной цели, которые по-прежнему считаются прерогативой аминокислотной последовательности. Он помогает сборке путем образования обратимых невалентных комплексов с развернутой или неполностью свернутой полипептидной цепью, ингибируя тем самым неправильные, ведущие к функционально неактивным структурам, взаимодействия. Многочисленные белки, выполняющие посттрансляционные химические модификации аминокислотных последовательностей, не входят в класс шаперонов, хотя и оказывают влияние на формирование активных нативных конформаций.

Таким образом, если принцип структурной самоорганизации белковых молекул в условиях *in vitro* может восприниматься в буквальном смысле слова, то в ситуации *in vivo* он должен обрести более широкое толкование, принимающее во внимание временное участие в сборке белка ферментов (дисульфидных и *цис-транс*-изомераз) и молекулярных шаперонов. Первые катализируют процесс за счет химических, ковалентных взаимодействий, а вторые — физических невалентных взаимодействий. И те, и другие не определяют геометрии и динамических свойств нативной конформации, и, следовательно, ее

функцию, а выполняют по ходу сборки вспомогательную ассистирующую роль, предохраняя свертывающуюся цепь от ошибочных внутренних и внешних контактов.

Из сказанного выше следует, что можно различать несколько видов сборки нативной трехмерной структуры белка. Во-первых, в условиях *in vitro* без белковых посредников, когда термодинамика и кинетика процесса в отсутствие денатуранта определяются только аминокислотной последовательностью; во-вторых, также в условиях *in vitro*, но в присутствии тех или иных ферментов или молекулярных шаперонов, оказывающих соответствующие воздействия на скорость процесса и его эффективность; в-третьих, в естественных, клеточных, условиях с участием ферментов и шаперонов. Сборка белков с помощью посредников, как показывают результаты работ последних лет, широко распространена. Однако, вопрос о том, все ли белки в процессе и сразу же после их синтеза на рибосомах нуждаются для своей сборки в ассистировании, остается открытым. Роль посредников может быть выяснена при исследовании раздельного влияния каждого из них на скорость свертывания *in vitro*, а в случае *in vivo* — при изучении мутантных и рекомбинантных модельных белков [221].

Открытие класса молекулярных шаперонов произошло при изучении функций белков теплового шока, принадлежащих трем различным семействам, которые обычно обозначают hsp60, hsp70 и hsp90 (аббревиатура heat shock protein; цифры указывают приблизительные значения молекулярных масс белков в кДа) [193]. Белки hsp широко распространены и постоянно присутствуют в целом ряде клеточных компартментов как прокариот, так и эукариот (табл. III.8). При возникновении стрессовых ситуаций (не только тепловых) их концентрации резко возрастают [222—225].

Белки этих семейств сильно отличаются по структуре, но функционально обладают рядом общих характерных особенностей. Как уже отмечалось, к ним относятся узнавание целевого полипептида и участие в его сборке, способность к связыванию и гидролизу АТФ, кооперативные взаимодействия шаперонов разных семейств и взаимодействия с другими белковыми факторами, инициация синтеза шаперонов при накоплении частично свернутых белков.

В табл. III.8 включены также белки, не относящиеся к семействам hsp, но причастные к процессам свертывания полипептидных цепей и сборки белковых комплексов. К ним относятся уже упоминавшийся нуклеоплазмин ядра клетки. В эндоплазматическом ретикулуме найден белок (TRAP или p28), образующий невалентный комплекс с CD3-цепью рецептора Т-клетки, который существует до окончания сборки всех субъединиц рецептора [260]. Другой белок этого же компартмента (88К) формирует переходные ассоциаты с вновь синтезируемыми тяжелыми цепями главного комплекса гистосовместимости [262]. В клетках *E. coli* белок SecB и триггер-фактор связывают незрелые секреторные предшественники до их выведения через цитоплазматическую мембрану [230]. Белок PapD, как предполагают, функционирует как шаперон в периплазматическом пространстве, способствуя

Функции молекулярных шаперонов [193]

Источник	Целевой полипептид	Шаперон	Функция	Литература
E. coli	Предшественники секреторных белков	GroEL	Задержка свертывания перед транспортом	[226—228]
		SecB		[229, 230]
		Триггер-фактор		[231, 232]
	ДНК-репликационный комплекс белков	DnaK/DnaJ	Реорганизация белкового комплекса	[233—235]
		GroEL/GroES		[236, 237]
		Опорные белки бактериофага		
	Чужеродные белки	DnaK	Стабилизация несвернутого белка (?)	[238]
	Белок микропили периплазматического пространства	PapD	Сборка микропили	[239, 240]
	Рубиско	GroEL/GroES	Сборка олигомера	[241—245]
	Рубиско	RuSBP	Сборка олигомера	[217, 243, 246]
Фотосинтетические бактерии	Митохондриальные белки-предшественники	Hsp70	Завершение транслокации	[247, 248]
			Стабилизация неполностью свернутых структур в матриксе	[249—251]
		Hsp60	Стабилизация неполностью свернутых структур и свертывание	[249]
	Синтезируемые секреторные белки	BiP	Реэкспорт предшественников в межмембранное пространство	[249]
			Завершение транслокации	[252]
			Стабилизация неполностью свернутых структур в каналах	[253—257]
	Мутантные или чужеродные белки	BiP	Стабилизация неполностью свернутых структур	[253, 258, 259]
	Субъединицы Т-клеточного рецептора	TRAP или p28	Сборка рецептора	[260, 261]
	Мутантные или чужеродные белки	BiP	Стабилизация неполностью свернутых структур	[253, 258, 259]
	Субъединицы Т-клеточного рецептора	TRAP или p28	Сборка рецептора	[260, 261]
Эндоплазматический ретикулум	Тяжелые цепи главного комплекса гистосовместимости (МНС) класса I	p88	Стабилизация вновь синтезируемых тяжелых цепей (?)	[262]
	Запасные белки растений	b70 (BiP)	Стабилизация вновь синтезируемых полипептидов (?)	[193]
	Синтезируемые полипептиды	Hsc-70 (Hsp70?)	Стабилизация неполностью свернутых структур (?)	[263]
	Митохондриальные и секреторные белки-предшественники	Hsc-70 (Hsp70?)	Разворачивание перед транслокацией	[264—266]
	Полипептид клатриновой оболочки окаймленного пузырька	Hsc-70 (клатрин-разделяющая АТРаза)	Связывание экспонированной петли легкой цепи клатрина, что способствует освобождению	[267, 268]
	Старые (?) белки	Hsc-70 (PrP73)	Транспорт к лизосомам для деградации	[269—271]
	Стероидные рецепторы	Hsp90	Стабилизация неактивной формы рецептора	[272—274]
	Белки, трансформирующие ретровирусы	Hsp90	Стабилизация неактивной формы белка при прохождении через плазматическую мембрану	[275, 276]
	Актин, тубулин	Hsp90	Стабилизация белковых субъединиц (?)	[277]
	Прерибосомы	Hsp70/Hsc70	Защита белков от тепловой денатурации	[278]
Ядро	Гистоны	Нуклеоплазмин	Сборка нуклеосом	[209, 279]

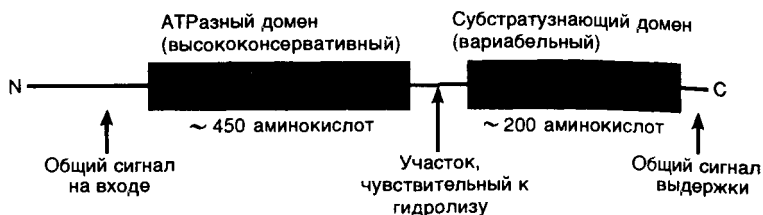
свертыванию белковых цепей и сборке микропилей в клетках *E. coli* [240]. Так называемые опорные белки (GroEL/GroES) участвуют в сборке головки и хвоста бактериофага, но не являются компонентами зрелого фага [237]. Очевидно, ввиду множества белков, нуждающихся при их молекулярной сборке и образовании комплексов в других белках-посредниках, в ближайшие годы следует ожидать открытия новых молекулярных шаперонов.

Рассмотрим подробнее функции наиболее изученных на сегодняшний день шаперонов, принадлежащих семействам белков теплового шока.

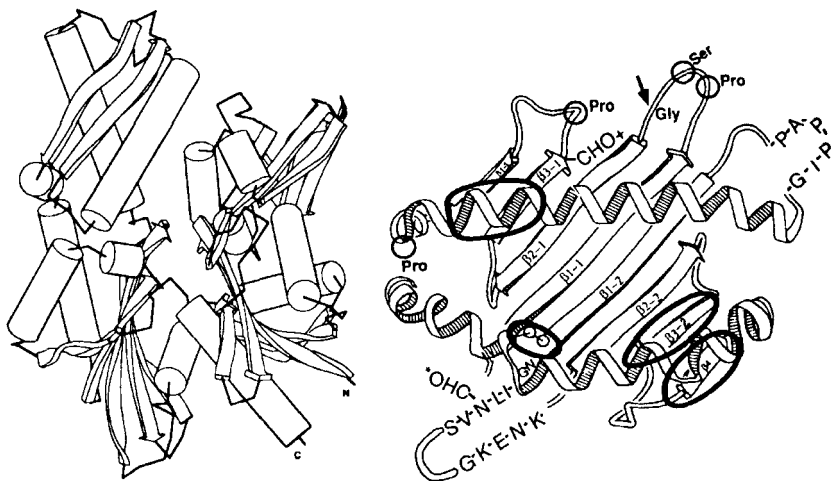
Шапероны hsp70. Трехмерные структуры белков этого семейства состоят из двух доменов. Один из них, АТР-связывающий домен, имеет высококонсервативную аминокислотную последовательность из 450 остатков N-концевой части белковой цепи (рис. III.25, [193]). Второй, С-концевой домен имеет вариабельную последовательность и состоит приблизительно из 200 аминокислотных остатков. Он обладает способностью образовывать невалентные комплексы с вновь синтезируемыми полипептидными цепями. Некоторые белки hsp70 содержат один или два коротких, обычно тетрапептидных, участка. Они составлены или из гидрофобных остатков и тогда служат для удерживания шаперона в мембране, или из гидрофильных остатков, что необходимо для ввода белков в органеллу. Примером могут быть митохондриальные шапероны hsp70. Между доменами находится участок, чувствительный к протеиназам. Образующийся при расщеплении молекул hsp70 один из фрагментов с молекулярной массой около 44 кДа обладает АТРазной активностью.

Кристаллографическая структура этого фрагмента одного из белков семейства hsp70 получена с разрешением 2,2 Å [280, 281]. Она представлена на рис. III.26, из которого видно, что АТРазный домен состоит из двух автономных половин с глубокой щелью между ними, предназначенной, по-видимому, для связывания АТР. Пространственная структура домена оказалась практически идентичной структуре АТРазного участка мономера G-актина и фермента гексакиназы, аминокислотные последовательности которых, однако, существенно различны. Мономеры G-актина при взаимодействии с АТР изменяют свою конформацию и полимеризуются, образуя филаменты [282]. Аналогичный процесс имеет место и у белков hsp70. Их конформационные изменения в N-концевой области при связывании и гидролизе АТР индуцируют конформационную перестройку более короткого пептид-связывающего домена, что, в свою очередь, приводит к изменениям во взаимоотношениях со сворачивающимся белком. Шапероны hsp70 животных клеток связывают развернутую полипептидную цепь менее прочно в присутствии гидролизующего АТР; добавление ADP ингибирует АТР-зависимое освобождение целевого полипептида. Такое поведение может быть объяснено тем, что замена ADP на АТР является скоростью-лимитирующей стадией процесса освобождения белка [277].

Вариабельность С-концевого домена белков hsp70 может опреде-



Р и с. III.25. Диаграмма линейной аминокислотной последовательности белков семейства hsp70 [193]



Р и с. III.26. Модель трехмерной структуры N-концевого АТФ-связывающего домена белка семейства hsp70 [193]

Р и с. III.27. Модель трехмерной структуры С-концевого пептидсвязывающего домена белков семейства hsp70 [193]

лять специфичность связывания целевого полипептида. Ф. Риппманн предложил модель пептид-связывающего домена из вторичных структур (рис. III.27) [283]. Модель демонстрирует возможность укладки α -спиральных и β -складчатых структур фрагмента hsp70, аналогичной укладке α_1 - и α_2 -доменов лейкоцитарного антигена ULA-1 главного комплекса гистосовместимости человека, трехмерные структуры которых известны [280]. Это позволило создать гипотетическую модель трехмерной структуры С-концевого домена белков hsp70. Предполагаемый пептидсвязывающий карман сформирован β -складчатыми фрагментами и "выстлан" гидрофобными аминокислотами. Сверху полость кармана прикрывают α -спиральные структуры. Связывание сворачивающегося полипептида происходит на протяженном участке. Для шаперона DnaK (табл. III. 8) методом ЯМР показана возможность связывания синтетического тридекапептида, не обладающего определенной структурой [193].

В клетке связывание и освобождение частично свернутого белка и шаперона контролируется специфическими белковыми модуляторами, или, как их иногда называют, кооперативными факторами при их невалентном взаимодействии с комплексом белок-шаперон [284]. Партнером DnaK являются белки DnaJ и GrpE. Белок DnaJ кодируется тем же опероном, что и DnaK, проявляет активность в виде димера двух одинаковых субъединиц с молекулярной массой около 41 кДа. При формировании тройного комплекса белок—DnaK—DnaJ возрастает сродство DnaK к целевому полипептиду и стимулируется гидролиз АТФ DnaK. Белок GrpE имеет молекулярную массу 22 кДа и индуцирует замену ADP на АТФ у DnaK в тройном комплексе.

Шапероны hsp90. Белки этого семейства изучены слабо. Предполагается, что они так же как и белки семейства hsp70 имеют АТФ- и пептидсвязывающие домены и содержат N- и С-концевые сигнальные тетрапептиды. К hsp90 отнесены белок HtpG клеток *E. coli* и *D. melanogaster* и два белка *S. cerevisiae*, различающиеся концентрацией и индуцибельностью. В животных клетках присутствуют белки hsp90, часто именуемые grp94 и ERp99 или эндоплазмином, аналогичные по строению и функции белку BiP семейства hsp70 [285].

Цитоплазматические белки hsp90 имеют молекулярную массу от 87 до 92 кДа. Они способны к ассоциации со многими клеточными белками, включая трансформированные белки ретровирусов, рецепторы стероидных гормонов, протеинкиназы клеток, актин и тубулин [277]. Общим свойством белков hsp90, по-видимому, является способность стабилизировать синтезируемые рибосомами белки в неактивном состоянии и не допускать их сборки. Белки hsp90 участвуют в инициации свертывания рецепторов стероидных гормонов и в последующей модуляции связывания ими ДНК и регуляции транскрипции [272, 273]. Показано, что апорецепторы, синтезированные в отсутствие hsp90, неспособны к регуляции процесса транскрипции и, следовательно, невосприимчивы к воздействию гормонов [274]. В нормальных условиях вновь синтезированный апорецептор формирует комплекс с димером hsp90, в котором рецептор зафиксирован в частично свернутой конформации, что препятствует его связыванию с ДНК. Ассоциация стероидного гормона с таким комплексом приводит к его диссоциации, а рецептор при этом обретает способность к взаимодействию с ДНК. Установлено, что область контактов шаперона hsp90 с рецептором включает участок из 80 аминокислотных остатков, где находится место связывания рецептора с гормоном. Однако причины специфичности взаимодействия hsp90 с рецептором и диссоциации их комплекса остаются еще не выясненными. Белки семейства hsp90 катионзависимо связывают АТФ и способны к автофосфорилированию. Но, в отличие от белков hsp70 и шаперонов, они не способны к каталитическому гидролизу АТФ [286].

Шапероны hsp60 (шаперонин-60). Эти белки отличаются структурно от шаперонов hsp70 и hsp90 тем, что представляют собой не отдельные молекулы, а сложные гомоолигомерные (в *E. coli*, митохондриях и хлоропластах) или гетероолигомерные (в архебак-

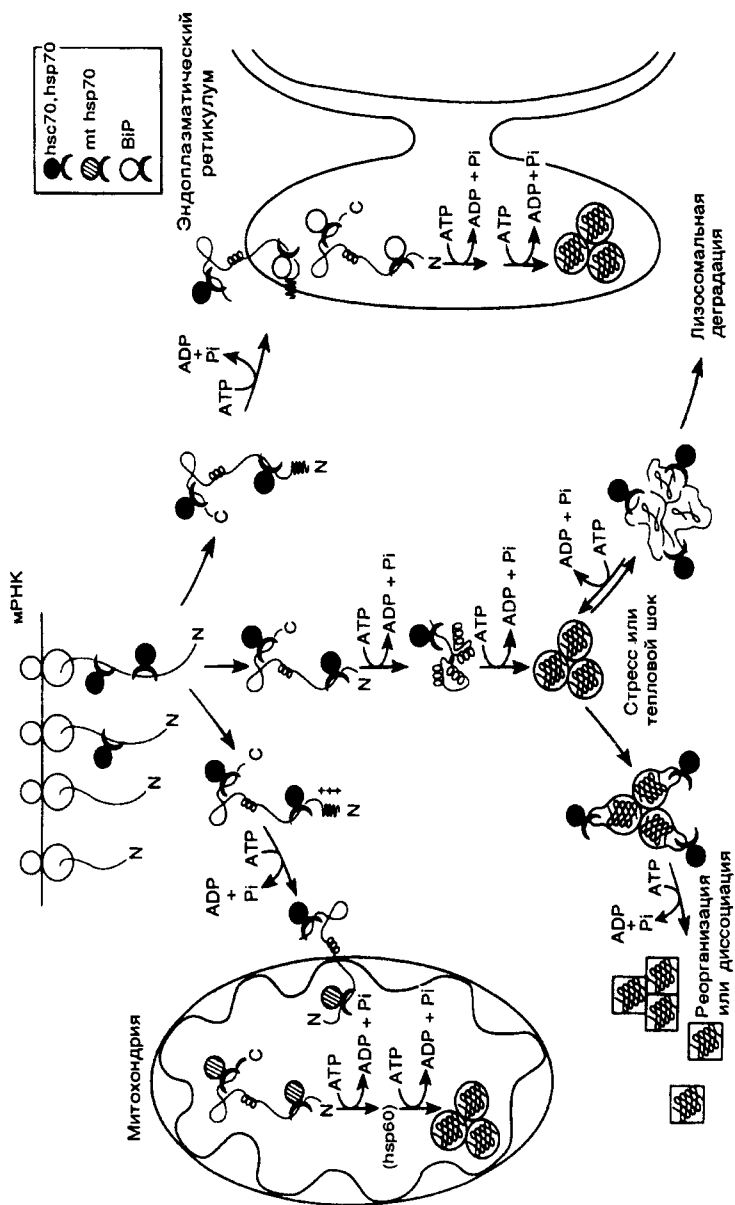


Р и с. III.28. Гипотетическая модель структуры шаперонина GroEL, иллюстрирующая в двух проекциях мультиплетные места связывания единичной полипептидной цепи

Черные прямоугольники вокруг плоскости — элементы узнавания и связывания полипептида; α -спирали — вторичные структуры связанного полипептида [193]

териях и клетках животных) комплексы [287]. Наиболее изучен шаперон *E. coli* GroEL. Согласно данным электронной микроскопии о четвертичной структуре GroEL, его молекулы ассоциированы в две связанные между собой кольцевые структуры, образующие двойной гептамерный тороид, названный "пончиком" [288, 289]. Диаметр внутренней полости, куда погружается белок с молекулярной массой до 90 кДа, составляет около 170 Å. Вспомогательным (кооперативным) белком при функционировании шаперона GroEL служит белок GroES с молекулярной массой 10 кДа. Он образует гептамерный комплекс, прикрывающий один из торцов тороида GroEL (рис. III.28).

Аналогичный комплекс двойного тороида был идентифицирован в цитозоле животных клеток [290—292]. Он не является гомологом уже известным шаперонам, что было подтверждено иммуноперекрестными реакциями. Оказалось, что белки, формирующие этот комплекс, эволюционно связаны с компонентами клеток архебактерий. В экстремальных термофилах *Pyrodicticum occultum* идентифицирован большой цилиндрический белковый комплекс с термостабильной АТФазной активностью [293]. Такой же комплекс присутствует в другом виде бактерий *Sulfolobus shibatae*. Он представляет собой два кольца, образованных из 8 мономеров каждое. Мономер TF-55 имеет молекулярную массу 55 кДа и гомологичен белку TCP1 ("N-complex polypeptide 1"), который является продуктом T-локуса созревающих сперматид мышей [287, 290—292]. Позднее гомологичные белки были обнаружены в сахаромикетах (*S. cerevisiae*), клетках яичек быка и ретикулоцитарном лизате кролика. Эти белки организованы в гетеро-олигомерный комплекс с молекулярной массой около 970 кДа, получивший название TRiC (TCP1 ring complex). Комплекс TRiC содержит белок TCP1 с молекулярной массой 60 кДа и 5—7 белков с молекулярной массой 50—68 кДа, которые пока не охарактеризованы.



Кроме того, в комплекс может входить различное число белков hsp70. Несмотря на то что комплекс является гетероолигомерным, по электронно-микроскопическим фотографиям он похож на гомоолигомерный комплекс клеток *E. coli* (рис. III.28). Внутренняя полость этих олигомеров, вероятно, значительно больше, чем у GroEL. В экспериментах *in vitro* TrIC проявляет шаперонную активность. Более подробно структура шаперонов-60 пока не изучена, однако наличие АТР-связывающего участка у каждого мономера весьма вероятно.

В экспериментах *in vitro* показано, что ренатурация таких ферментов как "рубиско", тиолсульфотрансферазы и α -гликозидазы происходит при образовании комплекса с шапероном-60 и шапероном-10 в присутствии АТР, ионов Mg^{2+} и K^+ (или NH_4^+). В отсутствие одного из этих компонентов восстановление активности фермента не происходит [242]. Стехиометрическое соотношение олигомерного шаперона в комплексе со свертывающимся белком — 1:1. Специфичность связывания в полипептидной цепи с шапероном неизвестна, однако ясно, что образуется прочный невалентный комплекс. По-видимому, прежде чем будут получены данные рентгеноструктурного анализа с высоким разрешением поверхности связывания шаперона с белком, нельзя предположить достоверного механизма связывания.

Свертывание белковой цепи, вероятно, происходит на поверхности шаперона (аналогично реактивации фермента на твердой матрице). Механически "пончиковая" структура комплекса GroEL может свидетельствовать о том, что полипептидная цепь способна протягиваться сквозь пору, как при трансляции на рибосоме. Попытки оценить конформационное состояние "субстратного" белка, связанного с шапероном, предпринимались с использованием спектральных методов, метода ограниченного протеолиза и функциональных методов (по выявлению ферментативной активности, связыванию конформационных антител) [268]. Исследовали взаимодействие GroEL, как молекулярного шаперона, с белками, содержащими α -спиральные и β -складчатые структуры, в частично свернутом и полностью денатурированном состояниях. Методом ЯМР было показано, что при взаимодействии пептида, соответствующего N-концевому α -спиральному участку роданазы, с шапероном исследуемый пептид принимает конформацию близкую к α -спиральной, тогда как просто в растворе его конформация случайна [294, 295]. Было предположено, что гидрофобная поверхность спирали служит "якорем" в "кармане связывания" шаперона. Но этот вывод не может быть применен к β -складчатой структуре, например к фрагменту антитела, который взаимодействующему с GroEL.

Наиболее стройная гипотеза молекулярного механизма функционирования шаперонов при свертывании белка предложена Дж. Мартином и Ф. Хартлом [296]. Схематично механизмы представлены на рис. III.29, где рассмотрено свертывание вновь синтезирующейся поли-

Р и с. III.29. Предполагаемый механизм свертывания синтезирующейся полипептидной цепи с участием шаперонов hsp70 (DnaK, DnaJ, GrpE) и шаперонов 60 (GroEL, GroES) [193]

пептидной цепи с участием шаперонов hsp70 (DnaK и вспомогательных белков DnaJ и GrpE) и шаперонинов-60 (GroEL и GroES).

При появлении N-концевого участка синтезирующейся полипептидной цепи протяженностью более 7 аминокислотных остатков из рибосомы происходит связывание шаперона DnaK. Позже при удлинении цепи до 50—60 аминокислотных остатков к цепи присоединяется вспомогательный белок DnaJ, который стабилизирует комплекс DnaK с белковой цепью и стимулирует ее АТРазную активность. По мере удлинения цепи с ней могут связываться следующие молекулы DnaK и DnaJ. При формировании такого тройного комплекса полипептидная цепь—DnaK—DnaJ происходит связывание и гидролиз АТФ, причем ADP остается присоединенным к тройному комплексу и при этом сродство DnaK к полипептидной цепи увеличивается, создавая прочный комплекс. Однако для достижения белком конечной конформации необходимо ее освобождение из комплекса с шапероном. Это происходит при участии белкового регуляторного фактора GrpE, который вытесняет ADP из комплекса DnaK—DnaJ, опять происходит связывание АТФ и уменьшается сродство полипептидной цепи к DnaK и ее конформационная перестройка. В том случае, когда такая перестройка приводит к формированию нативной структуры, полипептидная цепь освобождается из комплекса. Если же достижения нативной структуры не произошло, циклы повторяются.

В ряде случаев для белка недостаточно помощи hsp70 и они вынуждены прибегнуть к помощи шаперонина-60 для формирования конечной трехмерной структуры. Олигомерный белок hsp60 предотвращает неправильные взаимодействия между экспонированными участками глобул, которые могут привести к агрегации молекул белка. Шаперонины, по-видимому, взаимодействуют с уже полностью синтезированной и частично свернутой полипептидной цепью. При этом шаперонин GroEL находится в комплексе с GroES, который стабилизирует его ADP-форму, как и в случае hsp70 (DnaK—ADP стабилизируется DnaJ). Полипептидная цепь погружается в полость тороида, вероятно, формируя нековалентные связи с каждым его мономером. Сродство комплекса GroEL—GroES и связанных молекул ADP к полипептидной цепи при этом велико. Однако связывание самого белка приводит к дестабилизации комплекса, его диссоциации и освобождению ADP, который замещается на АТФ. При этом сродство GroEL к белку уменьшается и белок получает свободу внутри тороида для оптимизации своей конформации. Затем происходит гидролиз АТФ. ADP остается связанным с GroEL, а GroES стабилизирует эту связь, пододвигая, как предполагают с другой стороны тороида. Сродство к белку внутри тороида опять возрастает и цикл повторяется вновь до тех пор пока конформация белка не станет нативной, а значит не будет взаимодействия с GroEL, дестабилизации комплекса и вытеснения ADP. В этом случае молекула белка в нативной конформации освобождается из полости тороида. Известно, что для свертывания полипептидной цепи фермента тиосульфатсульфотрансферазы необходимо 130 молекул АТФ.

ОБЩАЯ ТЕОРИЯ
СВЕРТЫВАНИЯ БЕЛКОВОЙ ЦЕПИ

Рассмотренные в предыдущих главах III части исследования перехода свернутой белковой цепи в развернутую неструктурированную форму и обратного перехода флуктуирующей полипептидной цепи в исходную компактную трехмерную структуру позволили сформулировать фундаментальное положение о том, что нативная конформация белковой молекулы отвечает равновесному состоянию и, следовательно, не зависит от конкретных внешних условий и путей свертывания (*in vivo* или *in vitro*), т.е. от предыстории, а всецело определяется составом и порядком расположения аминокислот. Было доказано, что все необходимые сведения о физиологически активном пространственном строении белка и его конформационных возможностях заключены в аминокислотной последовательности. В процессах свертывания и разворачивания полипептидной цепи проявляется непосредственная связь между химическим и пространственным строением молекулы белка. Трансляция линейной последовательности в трехмерную структуру возможна, однако, только при определенных физиологических условиях. При их соблюдении процесс свертывания осуществляется спонтанно в том смысле, что принятие белком своей равновесной нативной конформации не требует специального морфогенетического молекулярного аппарата, как это имеет место, например, в случае пространственной организации молекул ДНК (о роли шаперонов в свертывании белков см. гл. 14).

Дать трактовку механизма свертывания белковой цепи из состояния статистического клубка в строго детерминированную трехмерную структуру означает ответить на следующие вопросы:

1. Каковы побудительные мотивы самопроизвольно протекающего процесса сборки природной аминокислотной последовательности в нативную конформацию. Или, другими словами, какие силы управляют процессом самосборки белковой цепи?

2. Каким образом беспорядочные и случайные конформационные флуктуации белковой цепи (вращения вокруг ординарных связей) спонтанно и безошибочно приводят к созданию вполне определенной трехмерной структуры белка?

3. Почему столь мала продолжительность сборки нативной конформации белка, осуществляемой по единственно возможному случайнопойсковому механизму, казалось бы неизбежно связанному с перебором огромного массива конформационных флуктуаций?

В течение последних десятилетий было предпринято много попыток ответить на эти вопросы. Тем не менее, все они оказались неудачными. В редких случаях, касающихся укладки белков, содержащих дисульфидные связи, удалось оценить через определенные последовательности возникновения промежуточных моно-, ди-, ...S—S-продуктов

ориентировочный порядок свертывания белковой цепи на пути к нативной конформации. Этот экспериментальный материал (по-видимому, самый ценный из всего того, что имеется на сегодняшний день в данной области) все еще остается в значительной мере невостребованным для более глубокого проникновения в проблему и разработки строгой теории свертывания белковой цепи. Исследования обратимой денатурации белков, проведенные в конце 1980-х—начале 1990-х годов, не внесли качественных изменений в понимание этого уникального явления. Поставленные вопросы так и остались без ответов [18, 110, 171, 172]. Развитие свелось к появлению некоторых новых терминов и новых феноменологических моделей, которые мало что добавили к сказанному ранее. Особенно оживленно обсуждаются модель гидрофобного схлопывания (hydrophobic collapse) и каркасная модель (framework model).

Первая из них основывается на предположении о том, что в начальный период свертывания в центре флуктуирующего клубка возрастает концентрация гидрофобных остатков [297—299]. Когда число их достигает критического значения, происходит реорганизация положений боковых цепей, резкое снижение энергии невалентных взаимодействий и быстрый переход (гидрофобное схлопывание) белковой цепи в новое, более компактное конформационное состояние, получившее название расплавленной глобулы (molten globule) [173, 300, 301]. По своим размерам и форме это состояние близко нативной структуре белка. Амидные группы его гидрофобного интерьера обменивают атомы водорода быстрее по сравнению с полностью свернутым состоянием, но медленнее, чем в состоянии статистического клубка [302, 303]. Модель гидрофобного схлопывания принципиально не отличается от рассмотренной в разделе 6.1 модели структурной организации белковой глобулы с гидрофобным ядром и гидрофильной внешней оболочкой, которая была предложена В.И. Лимом в 1974 г. и позднее детализирована им в серии работ [304—309].

Столь же неоригинальна каркасная модель сборки белка, базирующаяся на постулате, прямо следующим из гипотезы Полинга и Кори об энергетической предпочтительности регулярных вторичных структур, играющих в связи с этим центральную роль в определении пути структурирования белковой цепи. Предполагается, что процесс сборки начинается с появления изолированных и на первых порах изменчивых вторичных структур ("мерцающих кластеров"). Взаимодействуя друг с другом, они вытесняют молекулы воды, стабилизируют свои структуры и посредством гидрофобных контактов образуют единый, достаточно жесткий каркас третичной структуры [310, 311]. Очень близкое представление о свертывании белковой цепи заложено в так называемой диффузионно-коллизийной модели [312, 313]. По существу, аналогичные механизмы сборки рассматриваются также в работах [314, 315]. В основе всех предложенных моделей лежат гипотеза Полинга и Кори о вторичных структурах и гипотеза Козмана о гидрофобных взаимодействиях. Сам же подход к решению с их помощью проблемы свертывания белковой цепи строится на эмпирических корреляциях и равно-

весной термодинамике. В чем же причины отсутствия заметного прогресса в развитии этой области за последние 2—3 десятилетия? Главная причина, следующая как из общих соображений, так и конкретных результатов теоретического анализа и сопоставлений с опытными данными, заключается, на наш взгляд, в принципиальной несовместимости спонтанного, быстрого и безошибочного свертывания беспорядочно флуктуирующей белковой цепи в строго детерминированную трехмерную структуру, с одной стороны, и используемого для изучения данного явления аппарата классической статистической физики и равновесной термодинамики, с другой. Ни в одной работе по моделированию процесса структурной самоорганизации белка не обращено внимание на "противоестественность" с точки зрения этого аппарата самого феномена спонтанного возникновения высокоупорядоченной структуры из беспорядка. Сборка структуры белка является сугубо неравновесным процессом перехода от хаоса к порядку, и использованный во всех гипотетических моделях чисто статистический подход в принципе не мог привести к желанной цели.

В последующем изложении мы попытаемся обсудить несостоятельность равновесной термодинамики, решить проблему структурной организации белка и выяснить возможность в этом отношении нелинейной неравновесной термодинамики — физики открытых диссипативных систем, возникшей в первой половине 1980-х годов. Предпринимаемая попытка имеет, по-видимому, и более общее значение, так как биологические объекты всех уровней структурной организации являются открытыми системами. Учитывая это обстоятельство, а также демонстрируемую большинством авторов публикаций по свертыванию белковых цепей осведомленность в специфике используемого ими подхода, представляется целесообразным перед изложением общей теории самосборки белка кратко остановиться на некоторых принципиальных моментах и понятиях равновесной и неравновесной термодинамики.

15.1. ЭЛЕМЕНТЫ РАВНОВЕСНОЙ ТЕРМОДИНАМИКИ

Классическая равновесная термодинамика возникла как наука о взаимном превращении работы и энергии при наличии самой хаотичной в обычных условиях формы движения материи — тепловой. Годом рождения этой новой области физических знаний считается 1824 — год издания основного сочинения Сади Карно "Размышления о движущей силе огня".

Необходимость в разработке принципиально нового, термодинамического подхода к описанию поведения макроскопических систем возникла из-за того, что решение этой задачи оказалось не под силу ни классической физике, ни позднее квантовой механике. Непреодолимые для них трудности были вызваны невозможностью составления полной системы уравнений движения для множества частиц и незнанием начальных условий. Отказавшись от попытки проследить за движением каждой молекулы (атома, иона, коллоидной частицы), авторы

термодинамического подхода обратились к усредненным характеристикам огромного числа частиц, ответственных за характер поведения их ансамбля как единого целого. Естественно, отказ от детального анализа влияния свойств отдельных микроскопических систем и их взаимодействия на свойство макроскопической системы и переход к изучению коллективного проявления движения сразу всей совокупности частиц не могли не сделать термодинамический подход уникальным в отношении как его достоинств, так и ограничений, и не отразиться на специфике решаемых с его помощью задач.

Перечислим необходимые и достаточные требования, которым должна удовлетворять система, чтобы она могла стать объектом изучения методами равновесной термодинамики.

1. Система должна быть макроскопической, т.е. состоять из огромного количества частиц и/или иметь множество степеней свободы.

2. Макроскопическая система должна быть замкнутой, причем изоляция от внешней среды не должна заметно сказываться на свойствах системы и протекающих в ней процессах.

3. Движение микроскопических частиц, определяющих термодинамические свойства макроскопической системы, должно иметь беспорядочный, хаотический характер.

4. Процесс, который протекает в системе, удовлетворяющей отмеченным выше условиям, может стать предметом исследования равновесной термодинамики, если он не зависит от конкретного механизма взаимодействия микроскопических частиц и деталей их внутреннего строения.

5. Рассмотрению классической термодинамики подлежат те процессы в изолированной макроскопической системе, которые могут быть представлены как равновесные, т.е. состоящие из непрерывной последовательности обратимых, равновесных состояний системы.

6. Термодинамика равновесных процессов изучает только такие свойства макроскопической системы, которые не определяются флуктуациями термодинамических параметров.

Создание термодинамической модели с помощью статистической физики означает установление корреляций между двумя — макроскопическим и микроскопическим — уровнями информации о системе, удовлетворяющей перечисленным требованиям. Первый уровень описывается ограниченным числом термодинамических параметров (функций состояния, потенциалов), а второй — статистическим представлением микроскопических состояний и вероятностными значениями их физических характеристик. Случайность в поведении макроскопической системы, выведенная в начальный момент времени предположением о вероятностно-статистическом состоянии микроскопических частиц, характеризует лишь ее исходное хаотическое состояние. Дальнейшее поведение системы диктуется динамическими законами и корреляционными соотношениями между макроскопическими и микроскопическими параметрами [316].

Основу равновесной феноменологической термодинамики составляют несколько, на первый взгляд, предельно простых утверждений.

называемых началами или законами термодинамики. Обычно принято выделять четыре начала, которые, согласно А. Зоммерфельду, кратко формулируются следующим образом [317]:

1. температура является функцией состояния (нулевое начало);
2. закон сохранения энергии (первое начало);
3. энтропия и энергия (второе начало);
4. тепловая теорема Нернста (третье начало).

Второе начало термодинамики было впервые сформулировано в 1850 г. Р. Клаузиусом в виде следующего принципа: "Теплота не может переходить сама собой (позднее Клаузиус заменил последние слова на выражение "без компенсации") от более холодного тела к более нагретому". Энтропию (S) как функцию состояния Клаузиус ввел в 1865 г. при рассмотрении кругового обратимого процесса типа цикла Карно и поиске соотношения между имеющими место двумя превращениями тепла. Одно из них — переход тепла в работу, другое — переход тепла более высокой температуры в тепло более низкой температуры. Прийдя к выводу об увеличении энтропии изолированной системы при протекании в ней самопроизвольных процессов, Клаузиус обобщил второе начало термодинамики до вселенского закона, который сформулировал так: "Энтропия Вселенной стремится к максимуму". Из этого заключения следует, что эволюция Вселенной направлена к установлению равновесного состояния с максимальным значением энтропии и $dS = 0$.

Р. Клаузиус, как и другие создатели термодинамики, считал равновесную термодинамику началом и концом термодинамического подхода к объяснению природных явлений, т.е. наукой, в принципе доведенной до окончательного завершения. Такая точка зрения подтверждалась логической стройностью равновесной термодинамики, основанной на нескольких аксиомах, не знающих противоречий с физическим экспериментом и теоретически полностью обоснованной статистической физикой. Вплоть до середины XX столетия не возникало сомнения в том, что статистическая термодинамика полностью исчерпывает содержание и определяет возможности термодинамического подхода. Многие выдающиеся физики и физико-химики, в частности В. Нернст, не подозревали, что равновесная термодинамика окажется всего лишь элементарным введением к термодинамике будущего.

История естествознания, особенно последних десятилетий, показала, что самый высокий потенциал развития скрывался как раз во втором начале термодинамики, в этом важнейшем достижении физики XIX века, а также в теории флуктуаций, которые практически не принимались во внимание равновесной термодинамикой. "В истории науки, — говорил И. Пригожин в своей Нобелевской лекции (1977 г.), — второй закон термодинамики сыграл выдающуюся роль, далеко выходящую за рамки явлений, для объяснения сущности которых он был предназначен. Достаточно упомянуть работы Больцмана в области кинетической теории, разработку Планком квантовой теории излучения и Эйнштейном теории спонтанной эмиссии: в основе всех этих достижений лежит второй закон термодинамики".

В следующем разделе будет показано, какое богатейшее, качественно новое содержание открыл во втором начале сам Пригожин при разработке основ неравновесной термодинамики. Но и до этого формулировка второго начала, нахождение строгих и экспериментально проверяемых критериев неравновесного состояния и направленности неравновесных, самопроизвольных процессов и установление пределов их протекания открыли перед физикой принципиально новые возможности в описании картины окружающего мира. Приобретением своего дополнительного качества физика обязана введенному посредством второго начала термодинамики (закона возрастания энтропии) понятию о времени, но не просто о времени как таковом, а об ориентированном времени, или, по образному выражению А. Эддингтона, о "стреле времени".

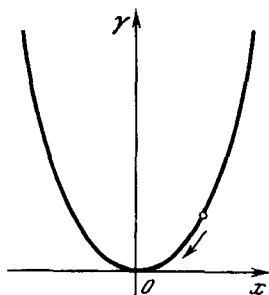
В чем же здесь дело, ведь время и раньше входило во все уравнения динамики и являлось предметом особого рассмотрения в теории относительности? Это действительно так, однако в динамическом описании системы, как в классическом, так и в квантовом, время играет ограниченную роль, поскольку и уравнение Гамильтона, и уравнение Шредингера инвариантны относительно обращения времени t в $-t$. Динамика Галилея и Ньютона, как и квантовая механика, не знают различий между прошлым и будущим, не знают эволюции физического мира; в их описании мир — это набор траекторий. И. Пригожин по этому поводу замечает: "...из всех изменений, происходящих в природе, классическая физика выделяет только движение. Все, что дает классическая физика, сводится к утверждению: изменение есть не что иное, как отрицание возникновения нового, и время есть всего лишь параметр, не затрагиваемый преобразованием, которое он описывает. Образ устойчивого мира — мира, избегающего процесса возникновения, вплоть до нашего времени оставался идеалом теоретической физики. Динамика И. Ньютона, дополненная его великими последователями П. Лапласом, Ж. Лагранжем и сэром У. Гамильтоном, представляла собой замкнутую универсальную систему, способную дать ответ на любой поставленный вопрос. Любой вопрос, на который динамика не могла дать ответ, отвергался как псевдопроблема почти по определению" [318. С. 41].

Вместо устойчивости и постоянства реальный мир полон, однако, эволюционных и неравновесных процессов, приводящих ко все большему разнообразию и всевозрастающей сложности, для которых первостепенное значение имеет именно направленность времени, его односторонность. Положительное направление времени, означающее развитие, второе начало термодинамики связывает с возрастанием энтропии. Теорема А.М. Ляпунова доказывает, что состояние равновесия является аттрактором неравновесных процессов, если производная специальной функции (носящей имя Ляпунова, создателя общей теории устойчивости) по времени (dy/dt) имеет знак, противоположный знаку самой функции. Смысл этого условия очевиден из рис. III.30. Второе начало термодинамики утверждает существование функции Ляпунова для изолированных систем и позволяет равновесное состояние считать

аттрактором неравновесных процессов. По определению М. Планка, необратимость есть не что иное, как проявление аттрактивности — стремления к равновесию.

Равновесная термодинамика, прежде всего анализ кинетического уравнения Больцмана, позволила сделать вывод о монотонном возрастании энтропии по мере приближения системы к положению равновесия, т.е. о постоянном увеличении хаотизации системы и всех ее подсистем и достижении в равновесном состоянии максимального беспорядка. Эволюция с точки зрения статистической физики и равновесной термодинамики осуществляется в изолированной системе путем

Р и с. III.30. Понятие асимптотической устойчивости функции Ляпунова



выравнивания ее свойств во всех возможных отношениях, усреднения всех характеристик и сглаживания всех неоднородностей. Монотонное увеличение энтропии, наблюдающееся у таких систем в процессах, протекающих без внешнего воздействия, исключает установление в равновесном состоянии градиента температур или давления, исключает диспропорционирование энтропии между подсистемами, т.е. увеличение энтропии (уменьшение порядка) одной части системы и уменьшение энтропии (увеличение порядка) другой при общем увеличении энтропии всей системы и, следовательно, без нарушения второго начала термодинамики.

Таким образом, равновесная термодинамика не отводит самопроизвольным неравновесным процессам какой-либо конструктивной роли в структурной организации макроскопической системы. П. Гленсдорф и И. Пригожин отмечают: "Классическая термодинамика есть, в сущности, теория разрушения структуры, а производство энтропии можно рассматривать как меру скорости этого разрушения" [319. С. 9]. Согласно уравнению Больцмана: $S = k \ln W$, где S — энтропия, k — постоянная Больцмана, W — термодинамическая вероятность. Чем больше число идентичных микроскопических состояний и, следовательно, беспорядочнее макроскопическое состояние системы, тем больше ее энтропия и вероятность реализации. В своем образном сравнении термодинамических функций состояния Зоммерфельд отводит принципу энтропии в "гигантской фабрике естественных процессов" роль "директора", который предписывает вид и течение всех энергетических сделок, а закону сохранения энергии — роль "бухгалтера", приводящего в равновесие дебет и кредит.

Трактовка второго начала статистической физикой и феноменологической термодинамикой приводит к двум принципиально новым, не следующим из классической физики и квантовой механики, положениям. Одно касается фундаментальной связи между неравновесностью и динамической природой системы. Статистический закон Больцмана утверждает, что неравновесность в термодинамике целиком определяет направленность любого процесса к состоянию максимального беспорядка как к самому вероятному; иными словами, неравновесность с точки зрения статистической термодинамики — источник беспорядка. Другое положение связано с распределением вероятностей структур в равновесном состоянии, т.е. с принципом порядка Больцмана. Вопрос о том, являются ли эти положения исчерпывающими, т.е. отвечающими всем наблюдаемым стационарным состояниям и всем совершающимся в природе процессам, сводится в конечном счете к вопросу о границах применимости второго начала (является ли оно универсальным и основополагающим динамическим принципом или справедливо только для равновесных состояний и равновесных процессов) и к вопросу о соответствии трактовки его с позиций классической статистической физики и равновесной термодинамики известным опытным фактам (объясняют ли данные трактовки поведение и структурное образование всех макроскопических систем).

Отмеченные вопросы, безусловно, возникли не сегодня, а более столет назад, вскоре после открытия второго начала термодинамики Р. Клаузиусом (1850 г.) и разработки эволюционной теории в биологии Ч. Дарвином (1859 г.). Физическая концепция развития утверждала, что самопроизвольно протекающие стохастические процессы должны непременно сопровождаться хаотизацией системы и выравниванием ее свойств. Продуктом свободы может быть только еще большая свобода. Биологическая концепция имела диаметрально противоположную направленность и декларировала возможность спонтанного возникновения порядка из хаоса. Продуктом свободы здесь является необходимость.

Эволюционные концепции в физике и биологии базировались на огромном экспериментальном материале. Однако между физическими и биологическими опытными фактами долгое время не находили прямой связи, одна концепция касалась явлений только неорганического мира, а другая — только мира растений и животных, и утвердилось представление, имевшее широкое распространение вплоть до середины XX в., о несовместимости законов физики и биологии и особой сущности явлений живой природы. Естествознание конца XIX в. и первых десятилетий XX в. еще не было готово к поиску причины противоположной направленности развития живого и неживого. Для многих исследователей, придерживающихся виталистических взглядов, а таких на рубеже двух столетий было подавляющее большинство, эта проблема вообще не считалась актуальной. Дело в том, что в то время были неизвестны физические и химические явления, противоречащие существовавшему тогда пониманию второго начала термодинамики. Более того, была постоянно наблюдаема его справедливость (течение

рек, расширение газа, выравнивание температур, диффузия и т.д.). Конечно, было известно, что в живой природе все происходит как бы вопреки термодинамике. Однако многие полагали, что у живой природы свои законы. К тому же, теоретическая физика была почти целиком обращена к миру атомов и элементарных частиц, а не в сторону биологических макромолекул, тем более клеток и организмов.

Оценивая уровень нашего сегодняшнего понимания возможностей термодинамического подхода, И. Пригожин в 1980 г. писал: "Следует, однако, четко осознавать, что формулировка второго начала с точки зрения современного физика представляет собой скорее программу, чем утверждение, так как ни Томсон, ни Клаузиус не указали точный рецепт, позволяющий выразить изменение энтропии через наблюдаемые величины" [318. С. 93]. Из последующего изложения мы узнаем, что решение поставленных вопросов о направленности эволюционного развития живого и неживого требует более углубленного понимания содержания второго начала и более детального проникновения в физику неравновесных процессов, формулировки ряда принципиально новых постулатов и разработки новых теоретических подходов.

15.2. ЛИНЕЙНАЯ ТЕРМОДИНАМИКА НЕРАВНОВЕСНЫХ ПРОЦЕССОВ

"Согласно результатам статистики, — писали Л.Д. Ландау и Е.М. Лифшиц, обсуждая второе начало термодинамики, — Вселенная должна была бы находиться в состоянии полного статистического равновесия. Между тем ежедневный опыт убеждает нас в том, что свойства природы не имеют ничего общего со свойствами равновесной системы, а астрономические данные показывают, что то же самое относится и ко всей доступной нашему наблюдению колоссальной области Вселенной" [320. С. 45]. Это действительно так. Ведь само существование органического мира и его взаимоотношение с неорганическим миром есть не что иное, как гигантский неравновесный процесс. И тем не менее, знание классической термодинамики является совершенно необходимым при изучении свойств любых больших ансамблей, в том числе и необратимых.

Здесь были обсуждены некоторые элементы равновесной термодинамики и статистической физики для того, чтобы провести последующее рассмотрение теории свертывания, а затем теорий структурной (том 3 настоящего издания) и функциональной (том 4) организации белковых молекул в доказательном плане, и сделать это по возможности более обстоятельным и исчерпывающим образом. Не менее серьезной причиной напоминания основ классической термодинамики послужило также наличие неразрывной связи ее с неравновесной термодинамикой. "Открытия, малые и великие ...никогда не рождаются спонтанно. Они всегда предполагают почву, засеянную предварительными знаниями и хорошо вспаханную трудом, как сознательным, так и подсознательным" [321. С. 62]. Эти слова А. Пуанкаре, ска-

занные им по поводу создания А. Эйнштейном теории относительности, в данном случае очень уместны. Неравновесная термодинамика при своем становлении опиралась на теоретические основы, более чем столетний опыт и математический аппарат равновесной термодинамики и статистической физики.

Принято считать, что термодинамика как особая область естественнонаучных знаний возникла потому, что в природе существуют макроскопические явления, которые не зависят от деталей внутреннего устройства микроскопических частиц. Такие явления, однако, в чистом виде практически не наблюдаются, и правильнее будет сказать, что появление этой науки вызвано существованием общих закономерностей в характере поведения макроскопических систем, которые определяются главным образом беспорядочным тепловым движением колоссального числа микроскопических частиц, а не конкретным строением отдельных частиц и их взаимодействием. Исходной моделью классического термодинамического подхода как к феноменологическому описанию тепловых явлений, так и к их статистической трактовке явилась модель идеального газа — системы материальных точек, упруго взаимодействующих друг с другом только в момент соударения. То обстоятельство, что в поведении идеального газа проявляются чисто статистические закономерности, позволило обойти нереальный механический подход к описанию макроскопической системы и перейти к ее сокращенному статистическому описанию, получившему название термодинамического подхода. Эта модель и стала основным объектом исследования статистической физики. Поэтому, строго говоря, классическая термодинамика — наука о равновесных состояниях и равновесных процессах идеального газа в условиях его изоляции. Такое определение термодинамики звучит несколько парадоксально, поскольку равновесных процессов и изолированных идеальных систем в природе нет, а, напротив, наблюдаются только неравновесные процессы, как, например, фазовые переходы и другие превращения, и помимо газов, имеются жидкости, твердые тела и иные сложные системы, причем отнюдь не изолированные, а всегда взаимодействующие с окружающей средой. Иными словами, существует то, что как будто бы не должно входить в компетенцию равновесной термодинамики, а то, чем она владеет, на первый взгляд, не имеет прямого отношения к реальному миру. В чем же тогда причина широчайшего распространения термодинамического подхода в естественных науках и технике?

Становлению равновесной термодинамики предшествовал период эмпирического развития, во время которого были установлены газовые законы Бойля—Мариотта (1662—1672 гг.) и Гей-Люссака—Шарля (1802 г.); на их основе Клапейроном (1834 г.) с учетом закона Авогадро (1811 г.) было получено основное уравнение газового состояния. Создание теоретических основ классической термодинамики началось, как уже отмечалось, с работы С. Карно об идеальном цикле тепловой машины (1824 г.), а завершилось формулировкой В. Нернстом (1906 г.) тепловой теоремы. Дальнейшее развитие термодинамического подхода

в течение ряда десятилетий происходило не за счет расширения и углубления его теоретического базиса, который оставался почти до середины нашего столетия на уровне конца XIX в. Эволюция равновесной термодинамики осуществлялась путем отхода от строгой классической модели в сторону эмпиризма. Реальные свойства макроскопических систем учитывались прежде всего введением соответствующих модификаций в канонические термодинамические функции. Примером может служить уравнение Ван-дер-Ваальса (1873 г.) представляющее собой уравнение состояния идеального газа, дополненного эмпирическими поправками на объем молекул и силы взаимодействия между ними.

Другой способ расширения возможностей равновесной термодинамики связан с введением таких эмпирических корреляций, которые в неявном виде учитывали бы все отклонения от идеальности и в то же время сохраняли соотношения идеальных систем для расчета термодинамических функций реальных систем. Примером в этом случае могут быть определяемые экспериментально коэффициенты активности, позволяющие перейти от концентраций веществ к кажущимся, эффективным характеристикам — активностям. Достоинство эффективных параметров состоит в том, что при их использовании сохраняется формальное тождество уравнений реальных и идеальных систем. Перечисленные способы приближения классической термодинамики к реальным объектам, а также чисто эмпирический путь установления соотношений между термодинамическими параметрами, функциями состояний и различными потенциалами соединений и систем значительно повысили прикладное значение подхода. Кроме того, расширению использования равновесной термодинамики способствовали еще три обстоятельства.

Одно из них заключалось в том, что вынужденные при изучении реальных систем отступления от условий и модели равновесной термодинамики никогда не вступали в противоречия с тремя ее основными законами и объединившим первые два фундаментальным соотношением Гиббса. Составив основу равновесной термодинамики, первое, второе и третье начала оказались несравненно более общими и более фундаментальными, чем свое собственное произведение. Поэтому нельзя отождествлять и ставить знак равенства между этими всеобщими, универсальными законами природы и широко используемой, но тем не менее частной теорией (равновесной термодинамикой). Второе обстоятельство связано с нашим сегодняшним высоким уровнем знания тонких деталей внутреннего строения молекул и межмолекулярных взаимодействий. Во многих случаях этих знаний оказывается достаточно для интерпретации результатов термодинамического изучения и расширения возможностей последнего за счет привлечения физических и физико-химических теорий и разного рода эвристических соображений. Наконец, расширению спектра рассматриваемых с помощью равновесной термодинамики задач способствовало еще одно немаловажное обстоятельство — отсутствие альтернатив. Вплоть до начала 1980-х годов в естествознании фактически отсутствовал другой

подход, способный приблизиться к анализу открытых макроскопических систем (а это весь органический мир). Привлекалась равновесная термодинамика, хотя она в принципе не в состоянии решать возникающие при изучении таких систем проблемы. Исключительно экстенсивное развитие термодинамики, по существу, не затрагивающее ее теоретических основ, не могло не вступить в противоречие с опытыми фактами. Проникая в область неравновесных процессов открытых макроскопических систем, коллективное поведение которых в большой мере определяется специфическими, детерминистическими (а не только случайными, статистическими) взаимодействиями микроскопических частиц и их внутренним строением, термодинамика, по-прежнему оставаясь равновесной, т.е. термостатикой, должна была обнаружить свою ограниченность. Согласно классическим представлениям второе начало термодинамики отражает лишь увеличение молекулярного хаоса, а равновесное состояние характеризуется полной однородностью системы во всех возможных отношениях; то есть конечное состояние термодинамической эволюции (необратимых) процессов. Таким образом, последним равновесная термодинамика не отводит никакой конструктивной роли; все самопроизвольно протекающие процессы направлены на разрушение структуры макроскопической системы как в целом, так и каждой ее подсистемы в отдельности. Кроме того, все выводы классической равновесной термодинамики о неравновесных процессах или неравновесных состояниях не учитывают времени. Утверждение о "стреле времени", т.е. о направлении процесса или его затрате, не дает представления о действительной скорости совершающегося события.

Разработка общей теории и методов анализа неравновесных процессов и неравновесных состояний — главная задача и содержание неравновесной термодинамики. Эта задача сложна и пока далека от своего решения, но она имеет принципиальный характер. В отличие от термодинамики равновесных процессов, базирующейся на единственной и четко формулируемой модели, неравновесная термодинамика в настоящее время не располагает подобной теоретической основой. Более того, сейчас даже неясно, возможна ли аналогичная теоретическая унификация этой области. Как показано ниже, природа и характерные особенности многих неравновесных процессов определяются взаимообусловленностью статистических свойств макроскопической системы и конкретных свойств ее составляющих микроскопических частиц. И тем не менее в 50-х годах нашего столетия произошел решительный переворот во взглядах на неравновесные процессы; были сформулированы общие положения, позволившие начать строить неравновесную термодинамику, не конкретизируя объект исследования с точки зрения его молекулярного строения. Суть происшедших сдвигов заключалась в осознании созидательных функций необратимых процессов в органическом и неорганическом мире. Это нашло отражение в трех сформулированных И. Пригожиным тезисах [318].

1. Понятие о необратимых процессах не менее важно, чем понятие об обратимых процессах, и имеет самостоятельное значение. Оно

отнодь не сводится только к дополнительным ограничениям законов, обратимым по времени.

2. Необратимые процессы играют существенную конструктивную роль в физике, химии и биологии. Они лежат в основе важных когерентных процессов, с особой отчетливостью проявляющихся на биологическом уровне.

3. Необратимость тесно связана с динамикой, и можно сказать, что необратимость возникает там, где основные понятия классической и квантовой механики (такие, как траектории и волновые функции) перестают соответствовать наблюдаемым.

Развитие современной термодинамики началось с формулировки ряда постулатов, которые не могут быть строго обоснованы в рамках макроскопических представлений и не являются столь же широкими обобщениями, как первые три начала термодинамики. Можно тем не менее утверждать, что выдвинутые положения, которые рассматриваются ниже, справедливы по крайней мере в случае малых отклонений от равновесия. Вместе с известными началами классической термодинамики новые положения, представляющие собой обобщения соответствующих экспериментальных данных, составили теоретическую основу линейной термодинамики неравновесных процессов. В отличие от равновесных статистических ансамблей характеристики неравновесных макроскопических систем изменяются со временем, а термодинамические параметры имеют разные значения в различных точках системы, т.е. зависят от координат. Существование в системе разности величин какого-либо интенсивного параметра (температуры, давления, концентрации) ведет к возникновению потока некоторого экстенсивного параметра (в конечном счете, вещества и энергии). Скорость переноса экстенсивной величины вследствие выравнивания интенсивного фактора в реальных условиях не будет бесконечно малой, как в случае равновесного, обратимого процесса. К типичным примерам неравновесной системы такого рода можно отнести: поток газа при наличии градиента плотности; поток жидкости, вызванный разностью гидростатических давлений; поток тепла (теплообмен) под действием градиента температуры; поток заряженных частиц в электрическом и магнитном полях и т.д.

Первые исследования в области термодинамики необратимых процессов, а именно теплопроводности, были выполнены в 1822 г. Ж. Фурье. В полученном им дифференциальном уравнении распространения тепла внутри твердого тела учитывались время и производные по времени. В 1826 г. Г. Ом экспериментально установил свой знаменитый закон электрической цепи; Дж. Стокс в 1845 г. разработал теорию движения вязкой жидкости (уравнение Навье—Стокса), а А. Фик в 1855 г. получил уравнение диффузии. Все это эмпирические истоки будущей неравновесной термодинамики. Ее становление в качестве особой области физики началось только в 1931 г., когда Л. Онсагер сформулировал принцип, представляющий собой обобщение физических соображений, лежащих в основе выводов уравнений движения Фурье, Ома, Стокса и Фика.

Для разнообразных необратимых процессов в широком интервале экспериментальных условий потоки энергии и массы являются линейными функциями термодинамических сил, т.е. градиентов соответствующих потенциалов (температуры, давления, концентрации). Сама по себе термодинамика не позволяет установить зависимость между величинами потоков той или иной природы, I_i , и силами, вызывающими эти потоки, X_j . Потоки редко бывают однородными и независимыми друг от друга. Например, диффузия сопровождается выравниванием температур, иными словами, поток массы вызывает поток тепла, и между ними возникает непосредственная связь. Л. Онсагер предположил, а опыт показал, что в большинстве случаев это действительно так: при небольших отклонениях от равновесия существует линейная связь между потоками I_i и термодинамическими силами X_j ($i, j = 1, 2, \dots, m$);

$$I_i = L_{ij}X_j.$$

Коэффициенты L_{ij} называются феноменологическими или кинетическими. Они не зависят от потоков и сил, но являются функциями параметров состояния и могут быть вычислены в рамках молекулярно-кинетической теории, т.е. методами статистической физики, или найдены экспериментально. Линейные термодинамические уравнения движения, как иногда называют такие соотношения, наименее справедливы для химических процессов, в которых потоком является скорость изменения концентрации реагирующих соединений (V), а термодинамической силой — химическое сродство (A). Линейное соотношение $V = LA$, как правило, удовлетворительно работает лишь в узкой области вблизи состояния химического равновесия.

По характеру зависимости между потоками и силами неравновесная термодинамика делится на две части: линейную и нелинейную. Первая изучает неравновесные процессы и состояния, удовлетворяющие линейным уравнениям движения, что обычно имеет место вблизи положения равновесия при небольших градиентах интенсивных параметров системы. Нелинейная термодинамика относится к неравновесным процессам и состояниям, которые находятся вдали от положения равновесия, характеризуются значительными градиентами и описываются более сложными соотношениями. Л. Онсагер сформулировал постулат, названный принципом симметрии кинетических коэффициентов (L_{ij}), или соотношением взаимности, который позволяет существенно упростить матрицу коэффициентов и тем самым облегчить задачу нахождения последних. Принцип Онсагера утверждает равенство недиагональных кинетических коэффициентов при соответствующем выборе потоков и термодинамических сил в линейных соотношениях, т.е. $L_{ij} = L_{ji}$. Эти равенства, обоснованные Онсагером с помощью статистической теории, предполагают, что неравновесные системы наделены следующим свойством: если на поток I_i , соответствующий необратимому i -му процессу, влияет термодинамическая сила X_j , то на поток I_j сила X_i оказывает воздействие с тем же пере-

крестным коэффициентом. Таким образом, соотношения взаимности связывают между собой различные физические процессы и позволяют по характеристикам одного из них предсказывать характеристики другого. Следствием принципа Онсагера является положение о том, что всегда существует явление, обратное какому-нибудь перекрестному процессу. Например, градиент температур вызывает прямой процесс — теплопроводность и служит одной из причин перекрестного процесса — переноса вещества (термодиффузия). Предсказываемое явление должно заключаться в том, что градиент плотности приводит к потоку теплоты и, как следствие, к появлению градиента температур, что и наблюдается на опыте. В трактовке соотношения взаимности проявляется определенная двойственность, которая придает ему характер универсальности и делает именно термодинамической зависимостью. С одной стороны, происхождение соотношения такого типа связано с особенностями молекулярной динамики системы, поскольку при их выводе Онсагер руководствовался не вытекающим непосредственно из начал термодинамики принципом микроскопической обратимости и гипотезой затухания флуктуаций. С другой стороны, такое соотношение касается сугубо макроскопических явлений, и само по себе проявляется только в рамках макроскопического описания, которое по определению не требует никакой специальной молекулярной модели. Это была первая попытка ввести в описание неравновесных процессов множественных систем параметры, отражающие в неявной и до предела упрощенной форме связь между статистическими свойствами макроскопической системы и термодинамическими свойствами микроскопических составляющих.

Другое фундаментальное положение линейной термодинамики заключается в представлении неравновесной системы Пригожиным (1947 г.) в виде суммы ее отдельных частей, находящихся в состоянии местного (локального) равновесия. Если в равновесной термодинамике функции состояния характеризуют систему целиком, то в случае неравновесных систем они относятся к ее отдельным областям, т.е. рассматриваются как локальные характеристики, однако, по-прежнему макроскопические и равновесные.

В любой физической неравновесной системе происходят процессы переноса, нарушающие равновесие, и внутренние, релаксационные процессы, стремящиеся восстановить равновесие. Существование локального равновесия в неравновесной системе требует выполнения условия, согласно которому скорость изменения макроскопического состояния должна быть значительно меньше скорости элементарного процесса, восстанавливающего равновесие. Это требование нам знакомо по равновесной термодинамике, но там оно относилось ко всей системе, а здесь — к отдельным ее частям. Его выполнение отнюдь не означает малости отклонения всей системы от равновесия. Принцип Пригожина о локальном термодинамическом равновесии, так же как и принцип Онсагера о соотношении взаимности, не может быть обоснован в рамках термодинамики необратимых процессов. И здесь это лишь постулат, справедливость которого можно оправдать только совпа-

дением результатов теории и опыта. Его плодотворность определяется прежде всего тем, что он декларирует неизбежность второго начала термодинамики и фундаментального соотношения Гиббса для неравновесных и равновесных процессов, несмотря на то, что термодинамические функции состояния первых в отличие от функций состояния вторых становятся зависимыми от координат и времени. Для этого необходимо выполнение еще одного требования. Оно заключается в том, чтобы продолжительность внешнего воздействия (t) была много больше времени элементарного релаксационного процесса τ , формирующего равновесие, т.е. $t \gg \tau$. Соотношение Гиббса начинает работать с того момента времени, когда процессы, приводящие систему к равновесию, успеют сформировать распределение, близкое к равновесному, что позволяет ее описывать на языке функций состояния (температуры, энтальпии, энтропии и т.д.).

Основой неравновесной термодинамики служит уравнение баланса энтропии. Для открытых систем, обменивающихся энергией и веществом с окружающей средой, изменение энтропии dS за время dt можно представить в виде суммы

$$dS = d_e S + d_i S,$$

где $d_e S$ — поток энтропии окружающей среды, $d_i S$ — производство энтропии внутри системы вследствие происходящих в ней необратимых процессов. Согласно второму началу термодинамики, для изолированной системы $d_e S = 0$ и $dS = d_i S > 0$ (условие эволюции) и $S = \max$, $d_i S = 0$ (условие равновесия). Главной физической величиной неравновесной термодинамики является производство энтропии $P = d_i S/dt$. Для описания неравновесных процессов эта характеристика играет столь же важную роль, как и энтропия в описании равновесных процессов. Согласно второму началу термодинамики у изолированных систем $P > 0$. Производство энтропии за счет процессов притока и оттока может быть как положительным, так и отрицательным. Система, способная отдавать энтропию среде, или, иными словами, поглощать отрицательную энтропию (негэнтропию), может эволюционировать в сторону порядка, т.е. вести себя принципиально иным образом, чем изолированная система. Подчеркнем еще раз, что если система полностью изолирована, но не находится в состоянии равновесия и в ней происходят какие-то макроскопические изменения, то они могут развиваться самопроизвольно только в направлении, которое приводит к возрастанию энтропии. Процессы с уменьшением энтропии возможны исключительно при контакте с внешней средой. Этот контакт должен быть постоянным в тех случаях, когда необходимо поддерживать устойчивое динамическое состояние системы или усиливать его (случай конвекции или вихря в потоке жидкости), и временным — до перехода системы в конечное состояние (случай кристаллизации). Таким образом, "антиэнтропийные" процессы могут быть только в открытых системах.

Теория стационарных процессов открытых систем как особого, не зависящего от времени и устойчивого по отношению к малым

отклонениям неравновесного состояния (по выражению Л. Берталанфи, состояние текущего равновесия), была разработана в 1945 г. И. Пригожиным. Он исходил из того, что для поддержания стационарного состояния должен происходить приток негэнтропии, компенсирующий производство энтропии, т.е. должно соблюдаться условие $d_e S = -d_i S < 0$, что же касается внутренней энергии, то здесь, напротив, ее изменение несовместимо с поддержанием состояния текущего устойчивого равновесия. Следовательно, протекающие в системе энергетические процессы должны быть обязательно диссипативны, т.е. $d_e U = 0$, где U — внутренняя энергия. Считая справедливым принцип локального равновесия, Пригожин предположил, что скорость приращения энтропии (производство энтропии) за счет необратимых процессов может быть представлена в виде

$$P = \frac{d_i S}{dt} = \sum_i I_i X_i,$$

где $I_i = L_{ij} X_j$. В этом случае для необратимых процессов в линейной области доказывается теорема о том, что открытая система, на которую наложены ограничивающие условия, остающиеся независимыми от времени, будет стремиться к постоянному режиму, отличному от равновесия, причем производство энтропии в стационарном неравновесном состоянии имеет минимум по отношению к вариации обобщенных сил, совместимых с граничными условиями, т.е.

$$\delta/\delta X_j (d_i S/dt) = 0.$$

Теорема Пригожина утверждает, что производство энтропии является неравновесной функцией состояния, играющей ту же роль, что и функции состояния в равновесной термодинамике. В открытой системе при бесконечно малых вариациях производство энтропии удовлетворяет следующим условиям: $dP > 0$ (условие эволюции), $P = \max$, $dP = 0$ (условие текущего равновесия).

Условие минимума производства энтропии выражает своего рода свойство инерции неравновесной системы, т.е. гарантирует ее устойчивость путем перехода в стационарное состояние "наименьшей диссоциации". Это условие указывает направление эволюции неравновесным системам. Теорема Пригожина о минимуме производства энтропии выполняется только в окрестности состояния равновесия. В системах, далеких от равновесия, термодинамическое поведение может быть совершенно иным, даже противоположным.

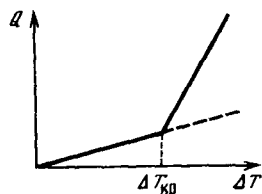
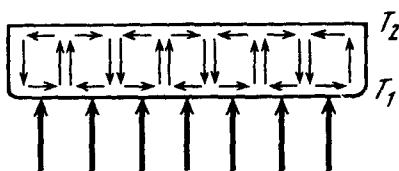
Итак, кроме начал классической термодинамики, аксиоматическое построение линейной неравновесной термодинамики дополнительно включает линейные соотношения между потоками и термодинамическими силами, соотношение взаимности Онсагера, принцип локального равновесия и принцип минимума производства энтропии Пригожина. Дополнительные постулаты не являются столь общими как начала термодинамики, и имеют для макроскопических систем не абсолютный (в статистическом смысле), а приближенный характер.

Однако, как и начала, они применимы (при соблюдении соответствующих условий) к анализу любых макроскопических систем без конкретизации молекулярного строения микроскопических составляющих. Ограниченность линейной неравновесной термодинамики заключается в том, что она, хотя и допускает возможность понижения энтропии открытых систем, но, как и термодинамика равновесных состояний и равновесных процессов, не может обосновать спонтанное образование новых упорядоченных структур и предположить для этого соответствующий механизм. Линейная область вследствие своей устойчивости представляет собой экстраполяцию равновесного режима и предполагает монотонное приближение к единственному стационарному состоянию вблизи положения равновесия.

15.3. НЕЛИНЕЙНАЯ ТЕРМОДИНАМИКА НЕРАВНОВЕСНЫХ ПРОЦЕССОВ

Линейная термодинамика неравновесных процессов не объяснила способность открытых систем к самоорганизации и не решила принципиальный вопрос о совместимости второго начала термодинамики с процессами структурирования и, следовательно, не устранила противоречивость физической и биологической формулировок эволюционных идей. Таким образом, не удалась попытка создать общую теорию неравновесных процессов путем минимальной коррекции основ равновесной термодинамики, без внесения в термодинамическое рассмотрение качественно новых элементов. Тем не менее проделанная работа сыграла важную роль в последующем развитии термодинамического подхода. Она явилась началом движения в правильном направлении, а именно в направлении изучения свойств стационарных процессов открытых систем при удалении от положения равновесия. Линейная неравновесная термодинамика показала (и в этом ее принципиальное достижение), что неперемненными условиями структурирования открытых систем являются, во-первых, наличие взаимообусловленности между свойствами макроскопической системы и ее микроскопических составляющих и, во-вторых, взаимодействие с привносящей негэнтропию окружающей средой. Дальнейшие исследования вскоре привели к широким обобщениям и формулировке ряда характерных особенностей термодинамических моделей самопроизвольной пространственной и временной структурной организации и, таким образом, к становлению нелинейной неравновесной термодинамики.

Перед обсуждением теоретических основ этой новой, важной для биологии и, в частности, проблемы белка, области знаний рассмотрим несколько примеров стационарных неравновесных физических, химических и биологических процессов, протекание которых приводит к формированию структур вдали от положения равновесия. Основные черты структурной самоорганизации открытой системы в условиях стационарного режима наглядно проявляются в образовании в тонком слое жидкости стоячих сравнительно стабильных структур (рис. III.31).



Р и с. III.31. Образование ячеек Бенара в слое жидкости, нагреваемой снизу ($T_1 > T_2$)

Р и с. III.32. Поток тепла Q в жидкости в зависимости от градиента температур

При небольшой разности температур нижней T_1 и верхней T_2 поверхностей слоя тепло в такой системе передается за счет теплопроводности. При повышении температуры T_1 и достижении температурным градиентом своего критического значения $\Delta T_{кр}$ (рис. III.32) покоящаяся теплопроводящая жидкость перестает справляться с переносом большого количества тепла, и устанавливается более благоприятный для процесса конвекционный режим перемещения жидкости с нижней нагретой поверхности в сторону холодной верхней поверхности слоя и обратно. Конвекционный поток циркулярного кооперативного движения молекул жидкости приобретает высокоорганизованную пространственную структуру в виде многочисленных цилиндрических или шестиугольных ячеек (ячеек Бенара), напоминающих пчелиные соты. Таким образом, из совершенно однородного состояния спонтанно возникает динамическая хорошо упорядоченная структура. Поскольку система при этом обменивается со средой только теплом (q) и получает, находясь в стационарном режиме, столько же тепла, сколько отдает, полный поток энтропии через нижнюю и верхнюю поверхности жидкости определяется выражением

$$\frac{d_c S'}{dt} = \frac{q}{T_1} - \frac{q}{T_2} = q \frac{T_2 - T_1}{T_1 T_2}.$$

Так как по определению $T_1 > T_2$, выражение имеет отрицательный знак и система, действительно, отдает энтропию, причем в стационарных условиях ровно столько, сколько производит. Потеря системой энтропии означает возникновение более высокой организации. Если следовать статистической термодинамике Больцмана, то упорядоченная конвекция Бенара должна иметь практически нулевую вероятность. В действительности же она оказалась самой предпочтительной. Поскольку высокоорганизованное когерентное состояние системы возникло далеко от положения равновесия, остается сделать вывод о неприменимости лежащей в основе больцмановской статистики теории вероятностей для описания неравновесных процессов открытых систем вдали от равновесия. Причина неприменимости, как будет показано далее, связана с флуктуациями, которые неустойчивы и размываются только в положении равновесия и в близкой к нему области. Вдали от него некоторые из флуктуаций или их определенные сочетания могут

выборочно усиливаться, в результате чего возникает новый молекулярный порядок, что по существу означает стабилизацию одной гигантской флуктуации.

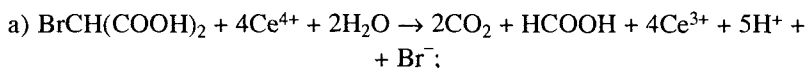
Флуктуации будут играть важную роль в последующем изложении. Поэтому поясним понятие флуктуации на известном примере хаотического движения коллоидной частицы в жидкости, открытого Р. Броуном в 1827 г. Лишь спустя 80 лет А. Эйнштейном и независимо М. Смолуховским была разработана теория броуновского движения, согласно которой перемещение частицы является результатом возникновения по разные ее стороны областей неодинаковой плотности жидкости, что приводит к мгновенной разности соударений окружающих ее частиц. Ситуация полностью описывается в рамках теории случайных процессов. Броуновское движение не прекращается во времени и это означает, что области неравномерной плотности вещества существуют всегда и при установившемся стационарном распределении жидкости или газа в объеме. Такие статистические все время возникающие и исчезающие области с большим или меньшим, чем в среднем, числом частиц в малом объеме и являются в данном примере флуктуациями. Следовательно, множество частиц обладает, и это является опытным фактом, еще одним важным свойством – иметь флуктуации – небольшие случайные отклонения от средних значений температуры, плотности, энергии, скорости движения частиц, положений атомных групп в молекуле и т.д. Во многих случаях флуктуации не приводят к заметному макроскопическому эффекту, ими вообще пренебрегают, например, в равновесной и линейной неравновесной термодинамике, кинетической теории газов и жидкостей и т.д. Вернемся, однако, к рассмотрению примеров самоорганизации системы вдали от положения равновесия, где они играют определяющую роль.

На том же, как при образовании ячеек Бенара, принципе кооперативного поведения микроскопических частиц, приводящего к макроскопическому структурообразованию, основаны усиление и генерация электромагнитного излучения в квантовых устройствах – лазерах. Активные атомы (молекулы) лазерного стержня под действием излучения накачки переходят в возбужденное состояние и начинают излучать. При малой мощности накачки атомы излучают свет независимо друг от друга; лазер в докритической области работает в режиме лампы накаливания. При достижении пороговой мощности лазерной генерации режим "обычной лампы" становится нестабильным и возникает качественно новое явление – индуцированное излучение, при котором все атомы начинают осциллировать в одной фазе и испускать один гигантский цуг когерентного лазерного излучения. Характер зависимости интенсивности излучения от мощности накачки такой же, как при образовании конвекционных ячеек Бенара в жидкости (рис. III.32). Аналогичны причины возникновения устойчивых вихрей, водоворотов и т.д.

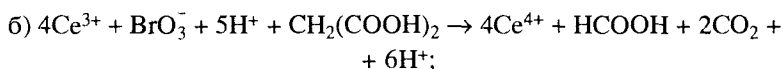
Рассмотренные неравновесные процессы в открытых системах обнаруживают между собой очевидное сходство. Они обладают общими закономерностями, характерными для процессов, получивших

название неравновесных фазовых переходов. Последние близки, если не идентичны, фазовым переходам второго рода, таким, как переход парамагнетик $\rightleftharpoons$ ферромагнетик, переход металла из обычного состояния в сверхпроводящее и т.д. В каждом из этих процессов скачкообразно меняется какой-то определенный физический фактор, представляющий собой меру упорядоченности микроскопических единиц данной макроскопической системы. Этот фактор обычно называют параметром порядка фазового перехода.

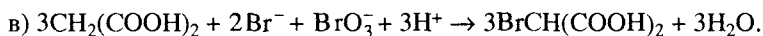
Классическим примером временной и пространственной упорядоченности в химических реакциях стала реакция Белоусова–Жаботинского. В 1958 г. Б.П. Белоусов опубликовал сообщение об открытии им еще в 1951 г. принципиально нового явления в химии – периодически действующей химической реакции окисления лимонной кислоты броматом калия в присутствии катализатора – ионов трехвалентного и четырехвалентного церия [322]. Существенный прогресс в понимании механизма реакции Б.П. Белоусова начался с появлением в 1964 г. работ А.М. Жаботинского [323, 324]. Если в раствор, содержащий серную и малоновую кислоты, сульфат церия и бромид калия, добавить индикатор окислительно-восстановительных реакций (ферроин), станет возможным визуальное наблюдение по изменению цвета за происходящими в смеси реакциями $\text{Ce}^{3+} \rightarrow \text{Ce}^{4+}$ и $\text{Ce}^{4+} \rightarrow \text{Ce}^{3+}$. Необычность наблюдаемого явления заключается в том, что цвет раствора строго периодически меняется от красного (избытка ионов Ce^{3+}) до синего (избыток Ce^{4+}). По-видимому, главную роль в ходе реакции Белоусова–Жаботинского играют следующие ее стадии:



(восстановление ионов церия)



(окисление ионов церия)



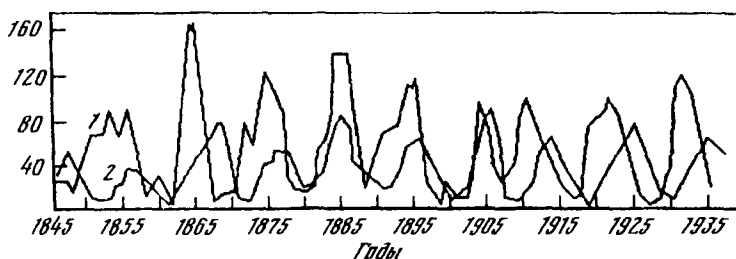
(синтез броммалоновой кислоты)

Эти реакции связаны между собой автокаталитическим механизмом, в котором первая реакция производит ионы Ce^{3+} , вторая, используя Ce^{3+} , поставляет Ce^{4+} , а третья реакция восстанавливает концентрацию броммалоновой кислоты, исходной для получения Ce^{3+} из Ce^{4+} . Таким образом, реакция Белоусова–Жаботинского ведет себя подобно так называемому брюсселятору – модели Пригожина–Лёфевра–Николиса с единым предельным циклом, в которой при различных начальных данных всегда реализуется одна и та же периодическая траектория в фазовом пространстве (в данном случае – в пространстве концентраций). Было показано, что в идентичных условиях концентрационные колебания в реакции Белоусова–Жаботинского

полностью воспроизводятся по амплитуде, форме и частоте. Период колебания здесь является однозначной функцией макроскопических переменных – концентрации и температуры. К пространственно-временной организации реакции Белоусова–Жаботинского был проявлен огромный интерес, вызванный открывшейся возможностью подойти посредством изучения подобных реакций к пониманию принципов механизма действия "биологических часов" – периодических и синхронных реакций в живых системах.

Примером временной структурной организации в биологии может служить периодически колеблющееся соотношение между популяциями хищников и их жертв. Представление о взаимозависимом изменении их численности во времени впервые было получено благодаря систематическому учету на протяжении 90 лет количества ежегодно заготавливаемых шкурок зайцев-беляков и рысей фирмой "Хадсон Бей" (Канада). Учет преследовал сугубо коммерческие цели, однако оказался полезным и для науки. Рыси, как известно, питаются травоядными зайцами. Чем больше зайцев и, следовательно, пищи, тем рыси интенсивнее размножаются. Со временем рост популяции рысей начинает сдерживаться из-за уменьшения зайцев вследствие их быстрого уничтожения. Уменьшение численности рысей ведет к росту числа зайцев. Рыси снова начинают быстро размножаться и т.д. Это типичный процесс, известный под названием процесса "хищник–жертва", математически описываемой моделью Лотки–Вольтерра. Состояние термодинамической системы, отвечающее такой модели, является промежуточным между устойчивым стационарным состоянием с минимальным производством энтропии и периодическим процессом с предельным циклом (брюсселятором). Для процесса Лотки–Вольтерра характерно состояние нейтральной устойчивости. Здесь отсутствует линейная связь потоков и сил, но, с другой стороны, нет механизма, обеспечивающего распад флуктуаций, поэтому и нет избранной траектории, к которой стремилась бы вся система. Реальная жизнь, конечно, сложнее, чем рассмотренная модель Лотки–Вольтерра, однако, как видно из рис. III.33, модель воспроизводит основные черты природных процессов – имеют место колебания численности популяций, численность рысей всегда отстает по фазе от численности зайцев, а амплитуды колебаний взаимосвязаны.

Все состояния системы, которые могут быть получены из равновесного путем непрерывной деформации равновесных структур. Пригожин назвал термодинамическими ветвями. Они имеют значительное сходство с равновесными состояниями, отвечают докритической области на соответствующих кривых, аналогичных представленной на рис. III.32, и описываются линейной термодинамической неравновесных процессов. К термодинамическим ветвям относятся ламинарное течение жидкости и многие другие линейные потоки вещества и энергии. При переходе за критические значения градиентов термодинамических сил линейные потоки размываются и у систем возникают совершенно новые структуры, которые Пригожин называл диссипативными. К ним он отнес упорядоченные в пространстве, но



Р и с. III.33. Динамика популяций зайцев (1) и рысей (2)

времени или одновременно и в пространстве и во времени состояния, которые могут перейти в состояние термодинамического равновесия только путем скачка (в результате кинетического, неравновесного фазового перехода). Рассмотренные конвекция жидкости с образованием ячеек Бенара, лазерное когерентное излучение, химическая реакция Белоусова–Жаботинского и периодический процесс "хищник–жертва" в экологии – примеры диссипативных структур, т.е. стационарных состояний вдали от положения равновесия.

Непременными условиями возникновения диссипативных структур можно считать следующие: 1) система должна обмениваться с окружающей средой веществом и/или энергией, т.е. быть термодинамически открытой; 2) динамические уравнения системы нелинейны, не работают соотношение взаимности Онсагера и принципы локального равновесия и минимума производства энтропии Пригожина; 3) отклонение системы от равновесного состояния не может быть представлено путем непрерывной деформации последнего, т.е. не может быть отнесено к той же термодинамической ветви. Значения градиентов соответствующих термодинамических параметров системы (температуры, давления, концентрации) превышают критические величины; 4) система должна состоять из взаимодействующих друг с другом микроскопических частиц; 5) организация упорядоченной макроскопической структуры есть результат как случайного, так и детерминистического (кооперативного, согласованного) взаимодействия микроскопических составляющих системы. Диссипативные системы являются статистико-детерминистическими образованиями.

Материальный и энергетический обмен диссипативной системы со средой (первое условие) происходит без нарушения второго начала термодинамики. Оно проявляется лишь в более общем виде и относится к такой изолированной макроскопической системе, в которую открытая диссипативная структура входит как подсистема. В отличие от самопроизвольных равновесных процессов, при которых все части системы хаотизируются и, следовательно, вносят вклад в общее увеличение энтропии, в нелинейных неравновесных процессах имеет место диспропорционирование энтропии, которое, однако, происходит без нарушения второго начала. Уменьшение энтропии при создании упорядоченной диссипативной структуры сопровождается одновременным

преобладающим увеличением энтропии остальной части изолированной системы.

Второе условие означает невозможность описания диссипативной структуры с помощью аппарата линейной термодинамики неравновесных процессов, а третье – утверждает качественное отличие диссипативной структуры от равновесного, как и любого другого близкого ему состояния. Четвертое и пятое условия характеризуют качественную новизну диссипативных систем с физической позиции, объясняя спонтанное возникновение высокоорганизованных пространственно-временных структур взаимообусловленностью макросостояния системы от конкретного строения молекулярных составляющих и согласованными кооперативными взаимодействиями последних в отличие от обычной склонности микрочастиц в термодинамических ансамблях к хаотическому поведению. Еще раз подчеркнем, что характер проявляющихся при определенных условиях специфических устойчивых взаимодействий обусловлен внутренним строением микроскопических частиц.

Таким образом, название "диссипативная структура" выходит за рамки чисто термодинамического понятия. Поэтому нелинейная термодинамика необратимых процессов представляет собой синтетический подход, объединяющий возможности термодинамики в описании макроскопического проявления множественных систем и физики в изучении свойств микроскопических частиц и их взаимодействий. Если общие заключения равновесной термодинамики и линейной неравновесной термодинамики не опираются на конкретные молекулярные модели, то выводы нелинейной неравновесной термодинамики не могут быть сделаны без учета физических особенностей микроскопических частиц.

Скачкообразное изменение свойств, получившее название бифуркации, означает резкое отклонение поведения системы от соответствующей термодинамической ветви или, другими словами, качественную перемену в поведении системы при кинетических значениях определяющих ее состояние параметров. Возникновение бифуркаций связано с флуктуациями, т.е. с беспорядочным, случайным явлением. В равновесных и линейных неравновесных системах флуктуации образуют сплошной фон, всегда неустойчивы, т.е. обратимы, и поэтому никаких бифуркаций не возникает. Совершенно иная ситуация имеет место в случае диссипативных структур. Хотя и здесь появление флуктуаций случайно, но не случайна их неодинаковая устойчивость, ведущая к специфической стабилизации некоторых из флуктуаций, определяемой природой микроскопических частиц, и детерминистическому механизму структурной самоорганизации. Можно сказать, что образование диссипативных структур – это бифуркационная эволюция флуктуаций, обусловленная в начале процесса внутренним строением и согласованными взаимодействиями микроскопических частиц, а затем вполне определенной структурой со специфическими, строго согласованными контактами между последовательно усложняющимися ансамблями, которые выступают как подсистемы формирующейся макроскопической диссипативной системы.

Таким образом, отдельные виды флуктуаций, спонтанно выделяю-

щиеся из сплошного спектра случайных отклонений и эволюционирующие при неравновесном процессе вдали от равновесия, предстают одновременно и как выразители индивидуальных свойств микроскопических частиц и их взаимодействий, и как накопители, усилители и интеграторы этих свойств, и тем самым как преобразователи и трансформаторы их в качественно новые макроскопические свойства диссипативной структуры. В равновесных и линейных неравновесных процессах флуктуации симметричны, их эволюция ограничена и в силу обратимости быстро затухает, в связи с чем они не играют существенной роли. Следовательно, общий характер этих процессов не зависит от особенностей тонкого строения и специфических взаимодействий микроскопических частиц. Именно благодаря данному обстоятельству равновесная термодинамика, как и линейная неравновесная термодинамика, обладает единым теоретическим базисом – универсальной теорией, не учитывающей внутренних свойств элементарных составляющих и справедливой для всех процессов такого порядка, и может строиться как наука исключительно на аксиоматической основе.

Нелинейная термодинамика неравновесных процессов в принципе не в состоянии быть совершенной по своему построению и завершенной наукой. При решении тех или иных вопросов она вынуждена учитывать уникальные микроскопические свойства изучаемой нелинейной системы. Ее теория должна включать, помимо общих термодинамических начал, также дополнительные, всегда специфические положения и модели, опирающиеся на конкретные результаты экспериментальных и теоретических исследований микроскопических свойств данной системы. Теория нелинейной термодинамики неравновесных процессов, очевидно, никогда не сможет стать в полной мере универсальной теорией диссипативных структур, обладающей единой, необходимой и достаточной термодинамической моделью. Теоретическое описание нелинейных процессов, т.е. расчет их количественных характеристик, предсказание структурной организации и свойств диссипативных структур, а также объяснение природы их устойчивости, всегда в той или иной мере уникально, поскольку включает особенности внутримолекулярных и межмолекулярных свойств микроскопических частиц. Невозможность создания единой нелинейной термодинамической модели, однако, не исключает наличия некоторых общих закономерностей в природе и, следовательно, в поведении неравновесных систем и не делает безнадежной разработку обобщенных математических и физических моделей, правильно описывающих характер протекания разнообразных, подчас далеко отстоящих друг от друга нелинейных термодинамических процессов. Теоретических моделей диссипативных структур создано немного. Наиболее детально разработаны уже упоминавшиеся периодическая модель Лотки–Вольтерра, описывающая процессы типа "хищник–жертва", и модель с предельным циклом Пригожина–Лефевра–Николиса (модель брюсселятора).

Эволюция неустойчивой динамической системы к высокоорганизованной диссипативной структуре посредством бифуркационных скачков включает как детерминистические, так и вероятностные этапы

спонтанного развития. В окрестностях точек бифуркаций существенную роль играют флуктуации, вызывающие отклонение от термодинамической ветви и определяющие направление, которому будет следовать система. Почему в данном случае флуктуации приобретают решающее значение? Из классической термодинамики известно, что флуктуации составляют столь небольшие изменения, что ими допустимо пренебречь, если система достаточно велика. Вблизи же бифуркаций этого делать нельзя, поскольку здесь нарушается закон больших чисел. Более того, можно утверждать, что самопроизвольное структурообразование в неустойчивых динамических системах осуществляется благодаря флуктуациям и только через них. Если в равновесных процессах все флуктуации обратимы, и поэтому пропадают, не успев оказать заметного воздействия на развитие макроскопической системы, то в нелинейных неравновесных процессах, некоторые из флуктуаций (далеко не все!) оказываются необратимыми, и при соответствующих условиях они могут накапливаться, приобретать значительную величину и становиться устойчивыми. Неравновесные флуктуации порождаются как самой системой, так и окружающей средой. И те и другие могут формировать бифуркации и приводить к новым неравновесным переходам, не предсказываемым феноменологическими законами эволюции.

Для того чтобы образовалась высокоорганизованная диссипативная структура, необходимо не только нахождение системы вдали от равновесия, но и наличие взаимодействий множества частиц или степеней свободы. Возникновение бифуркаций существенно зависит от размера системы и возможно только, если он достигает определенного, критического значения. Например, фазовый переход парамагнитного вещества в ферромагнитное требует не только достижения точки Кюри, но и превышения характерного для этого явления размера ферромагнетика. Масштабность системы здесь необходима для того, чтобы образовавшийся на пути к созданию диссипативной структуры локальный бифуркационный активный центр имел возможность эволюционировать и распространяться на всю систему. Положение в этом отношении аналогично ситуации с каплей жидкости в пересыщенном паре. Если ее размеры меньше критических, то она неустойчива, а если диаметр капли превышает критическое значение, она начинает расти, и пар превращается в жидкость. Тот факт, что спонтанный процесс структурной организации наблюдается только у систем, размеры которых превышают критические величины, свидетельствует о том, что формирование диссипативной структуры начинается с возникновения зародышевых активных центров и далее развивается подобно цепным химическим реакциям.

Флуктуации, самопроизвольно порождаемые самой системой, т.е. внутренние флуктуации, малы и обратимы до тех пор, пока система не окажется вблизи точек бифуркации, или областей сосуществования нескольких, одновременно устойчивых состояний. Глубокое воздействие на открытые системы оказывает окружающая среда, причем не только благодаря своему влиянию на ее макроскопические функции

состояния, но и посредством собственных флуктуаций, которым она также подвержена. Внешние флуктуации могут взаимодействовать с внутренними флуктуациями, размывать бифуркации данной системы или, напротив, усиливать их, а также создавать новые, и таким образом, управлять поведением диссипативной структуры и порождать другие неравновесные переходы. Участие среды в формировании у открытых систем диссипативных структур имеет принципиальное значение. В противном случае произошло бы нарушение второго начала термодинамики – закона увеличения энтропии изолированной системы. Процессы спонтанного образования высокоупорядоченных пространственных и временных структур всегда сопровождается диспропорционированием энтропии, т.е. резким уменьшением энтропии в открытой системе за счет превалирующего увеличения энтропии окружающей среды.

В начале второй половины нашего столетия стала очевидной невозможность описания возникновения в макроскопических системах когерентных структур на основе известных законов, применимых, подобно закону возрастания энтропии, к множеству частиц, не говоря уже о невозможности понимания этого явления. Классическая термодинамика, как и другие теории "среднего поля", оказались неподготовленными для выяснения причин спонтанного образования порядка из беспорядка за счет большей хаотизации окружающей среды. Возникшая в середине XX в. ситуация в принципе аналогична той, которая имела место в первой половине XIX в. когда выяснилась несостоятельность классической физики в описании поведения макроскопических систем. Теории бифуркаций диссипативных структур, а в общем плане – нелинейная термодинамика неравновесных процессов, по существу, представляют собой отход от унифицированных моделей теорий "среднего поля" и признание невозможности непротиворечивого объяснения эволюции (физической, химической и биологической) в рамках исключительно макроскопического описания, иными словами, является отказом от чисто вероятностных представлений классической и линейной термодинамики.

Становление нелинейной термодинамики – это рождение обобщенной физики, включающей и одновременно использующей в изучении одного явления как детерминистический подход и возможности классической физики и квантовой механики, так и вероятностный подход и возможности статистической физики и термодинамики. И. Пригожин в своей замечательной книге "От существующего к возникающему" по поводу чисто классического термодинамического описания замечает: "С самого зарождения ... науки мы свято верим в "простоту" всего микроскопического: молекул, атомов, элементарных частиц. Необратимость и эволюция входили в нашу картину мира как иллюзии, связанные со сложностью коллективного поведения внутренне простых объектов. Этой концепции ... вряд ли можно придерживаться сегодня. Элементарные частицы, как мы теперь знаем, представляют собой сложные объекты, способные рождаться и претерпевать распады. Если в физике и химии где-то и существует простота, то заведомо не в

микроскопических моделях. Она скорее кроется в идеализированных макроскопических представлениях, например, в простых движениях типа гармонического осциллятора или задач двух тел. Но стоит воспользоваться такими моделями для описания поведения больших или очень маленьких систем, как простота оказывается безвозвратно утерянной. А коль скоро мы утрачиваем веру в простоту микроскопического, у нас не остается иного выхода, как должным образом вновь включить время" [318. С. 93].

Качественные скачки в развитии физики непременно сопровождались изменениями в представлении о пространстве и времени, кардинальным образом расширяющими и углубляющими эти понятия. Так было при создании физики Галилея и Ньютона, физики Эйнштейна и Бора. Так произошло и при создании физики Пригожина. Непреходящее значение теории диссипативных структур и бифуркаций Пригожина, а также теории гиперцикла Эйгена, катастроф Тома и т.д., иными словами, всего того, что составляет сейчас нелинейную термодинамику, заключается не только в объяснении совместимости физической и биологической концепций эволюции, но и понимании взаимной дополнительности этих концепций, их внутреннего единства. Было ликвидировано противоречие в трактовке самопроизвольных процессов разрушения и созидания структур. Появилась возможность координировать макроскопический и микроскопический уровни описания, одновременно учитывать детерминистические и стохастические особенности систем.

В классической физике и квантовой механике, включая и релятивистскую механику, время, как уже отмечалось, выступает лишь как внешний параметр, не имеющий выделенного направления. В классической и квантовой динамике нет ничего такого, что позволило бы отличить прошлое от будущего. Такую динамику Пригожин назвал физикой существующего, а современную, в значительной мере созданную им термодинамику, – физикой возникающего. Даже равновесная термодинамика уже содержит специальную функцию состояния – энтропию, наделяющую время определенным направлением. Энтропия – это стрела времени, устанавливающая различие между прошлым и будущим. Нелинейная термодинамика неравновесных процессов идет в этом отношении еще дальше и формирует новое представление о времени как внутренней переменной, присущей данной макроскопической системе и отражающей ее историю. Такое время в отличие от внешнего времени характеризует эволюционное состояние системы, пройденные ею этапы развития. Еще Аристотель различал время как "движение" (кинезис) и время как "рождение и гибель" (метаболе). Возраст живого организма может определяться астрономическим временем, а может – внутренним, биологическим временем, не совпадающим с внешним временем, хотя и выраженным в тех же единицах. Два организма одного вида, рожденные одновременно (даже однояйцевые близнецы), имеют одинаковый возраст в масштабе внешнего, астрономического времени и в зависимости от условий созревания могут иметь разный возраст в масштабе внутреннего времени, ха-

рактизирующего уровень их биологического развития. "Для большинства основателей классической науки (и даже для Эйнштейна), — отмечает Пригожин, — наука была попыткой выйти за рамки мира наблюдаемого, достичь вечного мира рациональности — мира Спинозы. Но, быть может, существует более тонкая форма реальности, охватывающая законы и игры, время и вечность. Наш век по праву можно назвать веком исканий в изобразительном искусстве, музыке, литературе и науке. Мы все еще не в состоянии предсказать, чем завершится эта глава истории человечества. Несомненно лишь одно: она положила новый диалог между природой и человеком" [318. С. 95].

15.4. БИФУРКАЦИОННАЯ ТЕОРИЯ СТРУКТУРНОЙ САМООРГАНИЗАЦИИ БЕЛКОВ

Обсуждение неравновесной модели свертывания белковой цепи в нативную конформацию начнем с определения минимального фазового и компонентного состава системы, обеспечивающей спонтанное протекание процесса в изолированных условиях. Не нарушая общности модели, будем считать, что объектом рассмотрения является мономерный белок. Имеющиеся опытные данные о структурной самоорганизации белков позволяют представить укладку линейной полипептидной цепи в трехмерную структуру как внутримолекулярный процесс, который полностью определяется проявляющимися в соответствующих условиях свойствами единичной гетерогенной аминокислотной последовательности. Другими словами, будем считать, что свертывание природной полипептидной цепи не зависит от концентрации белка, и поэтому модель может включать лишь одну белковую молекулу. Кроме того, в систему, безусловно, должна входить водная фаза. Для феноменологического описания процесса не требуется учет конкретных специфических свойств среды, в конечном счете обуславливающих реализацию заложенной в белковой цепи потенции к самоорганизации. Полагаем водное окружение гомогенным, обладающим необходимыми для сборки белка свойствами.

Таким образом, выбранная модельная система состоит из двух подсистем — единичной природной аминокислотной последовательности и водной среды. Является ли такая двухфазная система объектом исследования равновесной термодинамики? Чтобы быть действительно таковой, система в целом и ее подсистемы должны удовлетворять всем условиям, отмеченным в разделе 15.1 для объектов классической термодинамики, и прежде всего представлять собой совокупности множеств не связанных друг с другом частиц. Макроскопичность белковой подсистемы определяется большим числом образующих молекулу белка атомов (10^3 – 10^4) и значительным количеством конформационных степеней свободы (10^2 – 10^3), позволяющих полипептидной цепи в принципе принимать множество микроскопических состояний (10^n , где n — число аминокислотных остатков в цепи). Тем не менее эту подсистему нельзя считать строго термодинамической. Во-первых, число

атомов и степеней свободы белковой макромолекулы по мерке равновесной термодинамики невелико. Во-вторых, и это самое главное, белковая подсистема не может быть представлена совокупностью беспорядочно перемещающихся и не взаимодействующих друг с другом атомов. Напротив, все они тесно связаны между собой посредством валентных и невалентных взаимодействий (дисперсионных, электростатических, торсионных и водородных связей). Тот факт, что разные природные аминокислотные последовательности в одинаковых условиях свертываются существенно различным образом, неоспоримо доказывает, что совокупность невалентных взаимодействий влияет на траекторию движений включенных в уникальную валентную схему атомных групп, делает движение атомов взаимозависимым, не в полной мере хаотичным, что в конечном счете и определяет процесс структурной организации белков. На это же указывают данные противоположного характера, полученные для синтетических полипептидов. В значительной мере лишенные специфических корреляций между аминокислотными остатками, они ни при каких условиях не образуют идентичных для всех молекул стабильных пространственных структур. Возможности их полипептидных цепей ограничены линейной спирализацией. Белковая молекула в водном окружении подвержена лишь одному виду истинно хаотического движения — броуновскому.

Что касается второй подсистемы — водного окружения, то она действительно состоит из множества малых молекул, склонных, однако, в силу своей природы к образованию сильных водородных связей и электростатическим взаимодействиям. Ни одно свойство жидкой воды не может быть описано на основе предположения о плотности хаотического движения отдельных молекул. Эксперименты, в частности инфракрасные спектры, вообще не обнаруживают в жидкой воде свободных молекул. Дж. Бернал еще в 1932 г. в своих, ставших классическими рентгеноструктурных исследованиях воды впервые наблюдал в ее жидкой фазе зародышевые формы кристаллов льда. Тщательный статистический анализ Г. Немети и Г. Шераги свидетельствует о присутствии в воде при нормальных условиях значительных количеств ассоциатов с 1–4 межмолекулярными водородными связями [325].

Специфика взаимодействия воды с природной аминокислотной последовательностью, раскрывающая возможность последней к структурированию, определяется не полностью независимым хаотическим, тепловым движением молекул H_2O , а сложной, многофазной структурой воды, сильным поверхностным натяжением (большой избыточной энергией поверхностного слоя), высокой избирательностью взаимодействий в контактном слое с разными по своей природе атомными группами белка.

Итак, выбранная модель белкового свертывания, включающая две эффективно взаимодействующие между собой подсистемы, не может быть отнесена к классическим макроскопическим системам равновесной термодинамики. Будем считать, что на протяжении всего процесса структурной самоорганизации белка наша система не обменивается с

окружающим пространством ни энергией, ни веществом, т.е. принадлежит к замкнутому типу систем. Исходим из того, что в начальный момент белковая молекула находится в состоянии флуктуирующего клубка. Аттрактором спонтанно возникающего изотермо-изобарического процесса свертывания полипептидной цепи является равновесное состояние, в котором белок приобретает высокоорганизованную, устойчивую трехмерную структуру. Процесс идет без нарушения второго начала термодинамики, т.е. протекает с повышением энтропии всей системы, и заканчивается, когда она достигает максимума. Очевидно, предлагаемая модельная система не может быть объектом рассмотрения классической равновесной термодинамики (см. раздел 15.1). Последняя оперирует только усредненными характеристиками и функциями состояний, а потому ограничена исследованием макроскопических систем с чисто случайным, полностью неупорядоченным и независимым движением микроскопических частиц. Равновесная термодинамика, как известно, в состоянии анализировать коллективное поведение огромного числа частиц, не вдаваясь при этом в детали их внутреннего строения и не конкретизируя механизм равновесного процесса. Особенно важно отметить то обстоятельство, что для классической термодинамики все случайные флуктуации системы неустойчивы, обратимы и, следовательно, не могут оказывать заметного, а тем более конструктивного воздействия на протекающий процесс и его инициацию. Все самопроизвольно совершающиеся явления в изолированной системе должны быть направлены, согласно равновесной термодинамике, на достижение однородности системы, т.е. на нарушение существующих структур, а не на их создание. Равновесные процессы всегда идут с увеличением энтропии не только всей системы, но и каждой ее подсистемы. Общим условием равновесия многофазной системы является равенство температур, давлений и химических потенциалов всех компонентов. В равновесной термодинамике отсутствуют какие-либо следствия из ее фундаментальных начал, которые указывали бы на принципиальную возможность диспропорционирования энтропии между различными фазами изолированной системы.

Обсуждаемая модельная система свертывания белковой цепи не отвечает основным положениям классической статистической физики: эргодической гипотезе и Н-теореме, принципу Больцмана о мультипликативности термодинамической вероятности, а также закону о равном распределении энергии по всем степеням свободы. Следование системой больцмановскому распределению вероятностей и больцмановскому принципу порядка лишено механизма структурообразования из беспорядка, и поэтому исключает саму возможность спонтанной сборки трехмерной структуры белка. Кроме того, практически невозможен перебор всех равноценных с точки зрения статистической физики конформационных вариантов (микроскопических состояний). Даже для низкомолекулярных белков (< 100 аминокислотных остатков в цепи) он занял бы около 10^{50} лет. В действительности же продолжительность процесса исчисляется долями секунд и секундами. Таким образом, величина порядка 10^{50} лет может служить своеобразной коли-

чественной мерой удаленности предложенных в литературе равновесных термодинамических моделей укладки белка от реального механизма свертывания природной аминокислотной последовательности.

Линейная неравновесная термодинамика изучает процессы, протекающие недалеко от положения равновесия (см. раздел 15.2). Для этого к известным началам равновесной термодинамики дополнительно вводится ряд новых постулатов уже не столь всеобъемлющего и строгого характера. Так, предполагаются постулированные Онсагером линейность термодинамических уравнений движения и симметричность кинематических коэффициентов, а также соблюдение сформулированных Пригожиным принципов локального равновесия и минимума производства энтропии. Привлечение этих частных и строго несоблюдаемых постулатов не ведет, однако, к расширению возможностей термодинамического подхода для объяснения механизма самоорганизации высокоупорядоченных структур. Изучение проводится путем экстраполяции равновесного состояния, т.е. по-прежнему на основе усредненных термодинамических характеристик системы. Молекулярная специфика объекта учитывается лишь неявным образом через эмпирически определяемые кинематические коэффициенты. Таким образом, наша модельная система не может рассматриваться с помощью не только равновесной, но и линейной неравновесной термодинамики.

Обратимся теперь к развитой Пригожиным в 1970–1980-е годы нелинейной термодинамике неравновесных процессов, важнейшими составными частями которой являются теории диссипативных систем и бифуркаций. На первый взгляд может показаться, что рассмотренные на ее основе системы существенно отличаются от выбранной системы структурной организации белков. Конвекционные ячейки Бенара, когерентное излучение лазера, турбулентное движение жидкости, реакция Белоусова–Жаботинского, модель Лотке–Вольтерра, описывающая взаимоотношения между "хищником и жертвой", – все это открытые диссипативные структуры. Динамические процессы перечисленных и подобных им неравновесных макроскопических систем, действительно, приводят при достижении условий, превышающих соответствующий критический уровень, к спонтанному возникновению из беспорядка высокоорганизованных пространственных, пространственно-временных и просто временных структур. Однако во всех случаях поддержание возникшего из хаоса порядка в стационарном режиме оказывается возможным только при постоянном энергетическом и/или материальном обмене между окружающей средой и динамической системой. Совершающийся в такой открытой системе неравновесный процесс вдали от положения равновесия связан с диссипацией, т.е. с производством энтропии, или, иными словами, с компенсирующим это производство потреблением негэнтропии из окружающей среды. Перекрывание внешнего потока негэнтропии автоматически приводит к прекращению системой производства энтропии и, как следствие, распаду созданной диссипацией структуры. У открытых диссипативных систем аттрактором является не равновесное состояние, а расположенное далеко от него состояние текущего равновесия.

Может показаться, что белковая подсистема, в отличие от отмеченных выше диссипативных систем, потребляет негэнтропию не постоянно, а только в период своей структурной самоорганизации. Созданная же структура термодинамически стабильна и как будто бы не нуждается в постоянной инъекции негэнтропии. Аттрактором процесса здесь служит не текущее равновесие, поддерживаемое внешним фактором, а равновесное состояние, к которому стремится свертываемая белковая цепь и которого она достигает, принимая нативную конформацию. Однако такое представление ошибочно, и белок является типичной диссипативной системой, нуждающейся в непрерывном притоке негэнтропии для создания своей структуры. В противном случае она была бы размыта деструктивными флуктуациями. Подобный эффект, если он возникает, обусловлен тем, что белковая цепь находится в среде своего негэнтропийного источника, с которым образует прямые молекулярные контакты. Таким образом, физиологически активная трехмерная структура белка и его водное окружение отвечают термодинамически устойчивому равновесному состоянию макроскопической двухфазной системы. Понятие текущего равновесия диссипативной подсистемы в данном случае совпадает с понятием равновесного состояния всей системы.

Согласно теории диссипативных систем и бифуркаций, возникновение порядка из беспорядка возможно только в ходе истинно неравновесного процесса, который даже в принципе не может быть представлен равновесным. Отличительная особенность истинно неравновесного процесса заключается в наличии у системы особых незатухающих, т.е. необратимых, флуктуаций, проявляющихся в определенных условиях и вызываемых специфическими молекулярными свойствами микроскопических составляющих, т.е. тем, что, по определению, не учитывается равновесной и линейной неравновесной термодинамикой. Последовательная цепочка таких взаимосвязанных и согласованных друг с другом и благодаря этому неравновесных и эволюционирующих в определенном направлении флуктуаций – непосредственная причина зарождения и развития порядка из хаоса.

И. Пригожиным были впервые разработаны физические принципы механизма диспропорционирования энтропии при самопроизвольных процессах. Они утверждают, что для понимания и априорного описания спонтанного возникновения порядка из хаоса необходимо установление количественных взаимоотношений между коллективным поведением макроскопической системы и индивидуальными свойствами ее микроскопических составляющих. Развитые Пригожиным представления нелинейной термодинамики могут служить основой теории свертывания белковой цепи. В пользу этого свидетельствует наличие у процессов структурной организации диссипативных систем и белков следующих общих черт: эволюции в сторону создания высокоорганизованных структур из хаоса, спонтанного протекания процесса, производства и диспропорционирования энтропии и, наконец, существования устойчивых бифуркационных флуктуаций.

Исходным состоянием обсуждаемой системы будем считать находя-

шуюся в водной среде белковую цепь в состоянии статистического клубка, которая совершает броуновское движение. Предполагаем, что в начальный период все флуктуации – периодические вращения атомных групп вокруг одинарных связей – являются беспорядочными и несинхронизированными друг с другом. В равновесных процессах они обратимы и поэтому не оказывают существенного воздействия на движение системы в сторону положения равновесия. В данном случае подавляющее большинство флуктуаций также обратимо и неустойчиво. Однако некоторые из флуктуаций сближают определенные атомные группы, которые могут эффективно взаимодействовать между собой. Благодаря этому сохраняются поначалу случайно появившиеся, но не случайным образом стабилизированные конформационные состояния тех или иных участков белковой цепи.

Какие же силы делают устойчивым определенное сочетание случайных отклонений? Очевидно, возникшее благодаря флуктуациям необратимое конформационное состояние пептидного фрагмента будет обладать наименьшей энергией и, следовательно, явится стабильным, если приведшие к его созданию флуктуации окажутся согласованными между собой. Это означает, что каждая из таких флуктуаций отвечает предпочтительному по энергии взаимному расположению ближайших атомных групп (например, в пределах одного аминокислотного остатка), а определенное сочетание таких флуктуаций приводит к дополнительным стабилизирующим взаимодействиям более удаленных атомных групп, принадлежащих соседним по цепи остаткам. Что нужно, чтобы такое событие, несмотря на случайность и беспорядочность всех флуктуаций, наверняка имело место? Для этого необходимо, чтобы единственно возможный при самопроизвольности процесса беспорядочно-поисковый механизм сборки белка осуществлялся за короткое время. На первый взгляд данное условие выглядит нереальным, так как число возможных комбинаций случайных и в значительной мере беспорядочных конформационных флуктуаций полипептидной цепи велико, а возможность появления среди них бифуркационных флуктуаций ничтожно мала. Так, перебор всех микроскопических состояний даже у самого низкомолекулярного белка занял бы не менее 10^{30} лет.

Противоречие между характером процесса и его продолжительностью снимается, если предположить, что актуальные на первом этапе сборки белка бифуркационные флуктуации могут возникать независимо на разных участках аминокислотной последовательности. Это предположение равносильно постулированию возможности образования при определенном сочетании согласованных флуктуаций конформационно жестких фрагментов только за счет невалентных взаимодействий входящих в него остатков. Время, необходимое для локальной структурной самоорганизации при беспорядочно-поисковом механизме ориентировочно равно, согласно Д. Уетлауферу, 10^{n-14} с (n – число остатков; 10^n – число возможных конформационных состояний белковой цепи; 10^{-14} с – время возникновения одного конформационного состояния) [326]. Следовательно, для пептидных фрагментов белковой цепи, например, с $n=12$ время сборки составляет всего 10^{-2} с. Процессы

структурирования разных олигопептидных участков последовательно могут идти параллельно с разными скоростями. Их независимость друг от друга предполагает чередование в белковой цепи конформационно жестких и лабильных фрагментов.

Таким образом, важнейшая особенность белков, обуславливающая неизбежность возникновения необратимых бифуркационных флуктуаций и, следовательно, саму возможность спонтанного возникновения из хаоса высокоорганизованной структуры, согласно предлагаемой теории, заключается в специфической конформационной неоднородности природной аминокислотной последовательности. Это положение отражает суть рассматриваемого явления, постулирует наличие неразрывной связи между химическим строением белковой цепи, ее конформационными свойствами и необратимыми флуктуациями. Гетерогенность природной аминокислотной последовательности ответственна за различие в конформационных возможностях отдельных участков. Конформационная гетерогенность альтернирующих жестких и лабильных белковых фрагментов порождает термодинамическую неоднородность флуктуаций, дифференцируя их на обратимые, равновесные, и необратимые, неравновесные. Такая связь обнаруживается только у отобранных эволюцией аминокислотных последовательностей.

Сборка белка начинается с чисто случайного, но неизбежного появления на некоторых олигопептидных участках цепи независимых друг от друга необратимых флуктуаций. Уникальные конформационные отклонения рано или поздно приведут к образованию за счет ближних и средних невалентных взаимодействий остатков нескольких жестких локальных структур – нуклеаций, разделенных участками, оставшимися подвижными. Таким образом, первый этап свертывания белковой цепи включает ряд параллельно идущих процессов структурирования отдельных фрагментов и завершается образованием первого промежуточного состояния (I_1). В результате на термодинамической ветви возникла первая бифуркационная точка, являющаяся поворотной в отношении направленности и характера дальнейшего развития событий; с этого момента механизм сборки белка становится истинно неравновесным процессом. Далее, также за счет случайно возникающих флуктуаций в специфические взаимодействия вовлекаются удаленные по цепи остатки, принадлежащие разным участкам белка. Их сближенность происходит опять-таки только при определенных и поэтому необратимых флуктуациях. Структурная стабилизация возникает здесь за счет пространственной комплементарности избирательно контактирующих конформационно жестких фрагментов.

Появление на втором этапе сборки за короткое время необратимых флуктуаций на значительно больших, но уже частично сконструированных участках также неизбежно при беспорядочно-поисковом механизме, поскольку увеличение количества взаимодействующих между собой аминокислотных остатков сопровождается уменьшением конформационных степеней свободы. Благодаря избирательности бифуркационных флуктуаций и их дополнительности друг к другу, ведущей к строгой согласованности, белок приобретает детерми-

нистические черты. Из конформационно-жестких фрагментов возникают нуклеации, которые через ряд случайных, но неизбежных событий входят в более крупные структурные образования (I_2), затем в домены и, наконец в нативную трехмерную структуру белка. Устойчивый и конструктивный характер бифуркационных флуктуаций обусловлен уникальной аминокислотной последовательностью.

Описанная общая теория свертывания белковой цепи – это первый шаг к созданию физической теории структурной самоорганизации белка и реального метода расчета, которые позволили бы определять координаты атомов нативной трехмерной структуры белковой молекулы, ее динамические конформационные возможности и механизм сборки по известной аминокислотной последовательности. Выше она сформулирована в общей, не допускающей прямой экспериментальной проверки форме. Значение теории состоит в том, что она, используя нелинейную неравновесную термодинамику, впервые смогла дать принципиальную и непротиворечивую трактовку важнейшим особенностям структурной организации белка: беспорядочно-поисковому механизму сборки природной аминокислотной последовательности, самопроизвольному характеру возникновения и протекания всех стадий образования высокоупорядоченной трехмерной структуры, большой скорости и безошибочности процесса. Кроме того, изложенная теория указала направление и содержание дальнейшего поиска, который привел к разработке физической конформационной теории белка, созданию метода априорного расчета его трехмерной структуры, подтвержденного конкретными примерами, и количественному описанию механизма свертывания белковой цепи [327, 328]. Подробно этот материал будет изложен в следующем томе настоящего издания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lumry R., Eyring H. // J. Phys. Chem. 1954. Vol. 58. P. 110–120.
2. Anfinsen C.B. // Science. 1973. Vol. 181. P. 223–230.
3. Левинталь С. // Молекулы и клетки. М.: Мир, 1968. Вып. 3. С. 29–47.
4. Бауэр Э.С. // Теоретическая биология. М.: ВИЭМ, 1935. С. 350.
5. Wetlaufer D.B., Ristow S. // Annu. Rev. Biochem. 1973. Vol. 42. P. 135.
6. Rupley J.A. // J. Mol. Biol. 1968. Vol. 35. P. 455–467.
7. Matthews B.W. Annu. Rev. Phys. Chem. 1976. Vol. 27. P. 493–520.
8. Wlodaver A., Miller M., Jaskolski M. et al. // Science. 1989. Vol. 245. P. 616–621.
9. Swain A.L., Miller M., Green J. et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1990. Vol. 87. P. 8805–8809.
10. Lee B., Richards F.M. // J. Mol. Biol. 1971. Vol. 55. P. 379–400.
11. Shrake A., Rupley J. // Ibid. 1973. Vol. 79. P. 351–363.
12. Chothia C. // Nature. 1975. Vol. 254. P. 304–306.
13. Klotz I.M. // Arch. Biochem. and Biophys. 1970. Vol. 138. P. 704–725.
14. Kuntz I.D. // J. Amer. Chem. Soc. 1972. Vol. 94. P. 4009–4012.
15. Tanaka S., Scheraga H.A. // Proc. Nat Acad. Sci. US. 1975. Vol. 72. P. 3802–3808.
16. Tanaka S., Scheraga H.A. // Ibid. 1977. Vol. 74. P. 1320–1327.
17. Wertz D.H., Scheraga H.A. // Macromolecules. 1978. Vol. 11. P. 9–15.
18. Creighton T.E. // Biochem. J. 1990. Vol. 270. P. 1–16.
19. Лим В.И. // Биофизика. 1974. Т. 19. С. 366–377.
20. Ламри Р., Билтонен Р. // Структура и стабильность биологических макромолекул / Пер. с англ. под ред. С.Н. Тимашеффа и Г.О. Фасмана. М.: Мир, 1973. С. 7–173.

21. *Klapper M.H.* // *Biochim. et biophys. acta.* 1971. Vol. 229. P. 557–563.
22. *Kauzmann W., Moore K., Schultz D.* // *Nature.* 1974. Vol. 248. P. 447–449.
23. *Tanford C.* // *Adv. Protein Chem.* 1968. Vol. 23. P. 121–282.
24. *Флори П.* Статистическая механика цепных молекул. М.: Мир, 1971. 401 с.
25. *Hvidt A., Nielsen S.O.* // *Adv. Protein Chem.* 1966. Vol. 21. P. 287–350.
26. *Creighton T.E.* // *J. Mol. Biol.* 1975. Vol. 95. P. 167–180.
27. *Snyder G.H., Rowan R., Sykes B.D.* // *Biochemistry.* 1976. Vol. 15. P. 2275–2282.
28. *Kausmann W.* // *Adv. Protein Chem.* 1959. Vol. 14. P. 1–63.
29. *Schellman J.A.* // *C.r. Lab. Carlsberg. Ser. chim.* 1955. Vol. 29. P. 230–237.
30. *Scheraga H.A.* // *Protein.* 1963. Vol. 1. P. 477–542.
31. *Tanford C.* // *Adv. Protein Chem.* 1970. Vol. 24. P. 1–121.
32. *Pace C.N.* // *Crit. Rev. Biochem.* 1975. Vol. 3. P. 1–73.
33. *Privalov P.L.* // *FEBS Lett.* 1974. Vol. 40. P. 140–143.
34. *Regan L., De Grado W.F.* // *Science.* 1988. Vol. 241. P. 976–978.
35. *Brandts J.F.* // *J. Amer. Chem. Soc.* 1964. Vol. 86. P. 4291–4301.
36. *Eisenberg M., Schwert G.* // *J. Gen. Physiol.* 1951. Vol. 34. P. 583–590.
37. *Brandts J.F.* // *J. Amer. Chem. Soc.* 1964. Vol. 86. P. 4302–4311.
38. *Hermans J., Acampora G.* // *J. Chem. Soc.* 1967. Vol. 89. P. 1547–1554.
39. *Privalov P.L., Khechinashvili N.N.* // *J. Mol. Biol.* 1974. Vol. 86. P. 665–674.
40. *Privalov P.L.* // *Adv. Protein Chem.* 1979. Vol. 33. P. 167–241.
41. *Wong K.P., Tanford C.* // *J. Biol. Chem.* 1973. Vol. 248. P. 8518–8525.
42. *Robson B., Pain R.H.* // *Biochem. J.* 1976. Vol. 155. P. 331–345.
43. *Jaenicke R.* // *Angew. Chem.* 1984. Bd. 23. S. 395–413.
44. *Jaenicke R.* // *Progr. Biophys. and Mol. Biol.* 1987. Vol. 49. P. 117–237.
45. *Simpson R.B., Kausmann W.* // *J. Amer. Chem. Soc.* 1953. Vol. 75. P. 5139–5146.
46. *Ahmad F., Salahuddin A.* // *Biochemistry.* 1976. Vol. 15. P. 5168–5174.
47. *Pohl F.M.* // *Europ. J. Biochem.* 1968. Vol. 7. P. 146–153.
48. *Tanford C.* // *Adv. Protein Chem.* 1970. Vol. 24. P. 1–95.
49. *Ikai A., Tanford C.* // *Nature.* 1971. Vol. 230. P. 100–102.
50. *Tsong T.Y.* // *Biochemistry.* 1975. Vol. 14. P. 1542–1547.
51. *Teipel J.W., Koshland D.E.* // *Ibid.* 1971. Vol. 10. P. 797–804.
52. *Epstein H.F., Schechter A.N., Chen R.F., Anfinsen C.B.* // *J. Mol. Biol.* 1971. Vol. 60. P. 499–508.
53. *Tsong T.Y., Baldwin R.L., McPhie P.* // *Ibid.* 1972. Vol. 63. P. 453–475.
54. *Garel J.R., Baldwin R.L.* // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1973. Vol. 70. P. 3347–3354.
55. *Garel J.R., Baldwin R.L.* // *J. Mol. Biol.* 1975. Vol. 94. P. 611–632.
56. *Garel J.R., Nall B.T., Baldwin R.L.* // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1976. Vol. 73. P. 1853–1860.
57. *Brandts J.F., Halvorson H.R., Brennan M.* // *Biochemistry.* 1975. Vol. 14. P. 4953–4963.
58. *Givol D., De Lorenzo F., Goldberger R.F., Anfinsen C.B.* // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1965. Vol. 53. P. 676–682.
59. *Creighton T.E.* // *Progr. Biophys. and Mol. Biol.* 1978. Vol. 33. P. 231–297.
60. *Kassell B., Laskowski M.* // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1965. Vol. 20. P. 463.
61. *Huber R., Kukla D., Bode W. et al.* // *J. Mol. Biol.* 1974. Vol. 89. P. 73–101.
62. *Deisenhofer J., Steigemann W.* // *Acta crystallogr.* 1975. Vol. 1331. P. 238–250.
63. *Creighton T.E., Kalef E., Arnon R.* // *J. Mol. Biol.* 1978. Vol. 123. P. 129–147.
64. *Rosen P.A., Creighton T.E., Blout E.R.* // *Biochemistry.* 1983. Vol. 22. P. 2433–2440.
65. *States D.J., Creighton T.E., Dobson C.M., Karplus M.* // *J. Mol. Biol.* 1987. Vol. 195. P. 731–739.
66. *Hollecker M., Larcher D.* // *Europ. J. Biochem.* 1989. Vol. 179. P. 87–94.
67. *Saxena V.P., Wetlaufer D.* // *Biochemistry.* 1970. Vol. 90. P. 5015–5021.
68. *Cleland W.W.* // *Ibid.* 1964. Vol. 3. P. 480–486.
69. *Creighton T.E.* // *J. Mol. Biol.* 1974. Vol. 87. P. 563–578.
70. *Lowe J.P.* // *Progr. Phys. and Org. Chem.* 1968. Vol. 6. P. 1–10.
71. *Fraser R.R., Boussard G., Sanders J.K. et al.* // *J. Amer. Chem. Soc.* 1971. Vol. 93. P. 3822–3828.
72. *Allinger N.L., Hickey M.J., Kao J.* // *Ibid.* 1976. Vol. 98. P. 2741–2748.
73. *Creighton T.E.* // *J. Mol. Biol.* 1975. Vol. 95. P. 167–199.

74. Creighton T.E. // *Ibid.* 1974. Vol. 87. P. 579–618.
75. Creighton T.E. // *Biophys. Chem.* 1988. Vol. 31. P. 155–162.
76. Goodman E.M., Kim P.S. // *Biochemistry.* 1989. Vol. 28. P. 4343–4347.
77. Manning M.C., Woody R.W. // *Ibid.* 1988. Vol. 28. P. 8609–8613.
78. Oas T.G., Kim P. // *Nature.* 1988. Vol. 336. P. 42–48.
79. Anfinsen C., Haber E., Sela W., White F. // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1961. Vol. 47. P. 1309–1314.
80. Anfinsen C.B. // *Harvey Lect.* 1967. Vol. 61. P. 95–104.
81. Hantgan R.R., Hammes G.G., Scheraga H.A. // *Biochemistry.* 1974. Vol. 13. P. 3421–3432.
82. Ahmed A.K., Schaffer S.W., Wetlaufer D.B. // *J. Biol. Chem.* 1975. Vol. 250. P. 8477–8494.
83. Creighton T.E. // *J. Mol. Biol.* 1977. Vol. 113. P. 275–312.
84. Creighton T.E. // *Ibid.* P. 313–328.
85. Creighton T.E. // *Ibid.* P. 329–341.
86. Chavez L.G., Scheraga H.A. // *Biochemistry.* 1977. Vol. 16. P. 1849–1857.
87. Schaffer S.W. // *Intern. J. Peptide and Protein Res.* 1975. Vol. 7. P. 179–185.
88. Schaffer S.W., Ahmed A.K., Wetlaufer D.B. // *J. Biol. Chem.* 1975. Vol. 250. P. 8483–8491.
89. Creighton T.E. // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1988. Vol. 85. P. 5082–5086.
90. Wearne S.J., Creighton T.E. // *Proteins.* 1988. Vol. 4. P. 251–261.
91. Pace C.N., Creighton T.E. // *J. Mol. Biol.* 1986. Vol. 188. P. 477–486.
92. Freedman R.B. // *Cell.* 1989. Vol. 57. P. 1069–1072.
93. Creighton T.E., Hillson D.A., Freedman R.B. // *J. Mol. Biol.* 1980. Vol. 142. P. 43–62.
94. Epstein C.J., Goldberger R.F. // *J. Biol. Chem.* 1963. Vol. 238. P. 1380–1392.
95. Bradshaw R.A., Kanarek L., Hill R.L. // *Ibid.* 1967. Vol. 242. P. 3789–3795.
96. Ristaw S.S., Wetlaufer D.B. // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1973. Vol. 50. P. 544–550.
97. Anderson W.L., Wetlaufer D.B. // *J. Biol. Chem.* 1976. Vol. 251. P. 3147–3155.
98. Acharya A.S., Taniuchi H. // *Ibid.* P. 6934–6939.
99. Acharya A.S., Taniuchi H. // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1977. Vol. 74. P. 2362–2369.
100. Pfeil W., Privalov P.L. // *Biophys. Chem.* 1976. Vol. 4. P. 23–50.
101. Privalov P.L. // *Annu. Rev. Biophys. Chem.* 1989. Vol. 18. P. 47–69.
102. Sturtevant J.M. // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1977. Vol. 74. P. 2236–2240.
103. Spolar R.S., Ha J.-H., Record M.T. // *Ibid.* 1989. Vol. 86. P. 8382–8385.
104. Becktel W.J., Schnellmann J.A. // *Biopolymers.* 1987. Vol. 26. P. 1859–1877.
105. Baldwin R.L. // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1986. Vol. 83. P. 8069–8072.
106. Griko Yu.V., Privalov P.L., Venyaminov S.Yu., Kutysenko V.P. // *J. Mol. Biol.* 1988. Vol. 202. P. 127–138.
107. Privalov P.L., Griko Yu.V., Venyaminov S.Yu., Kutysenko V.P. // *Ibid.* 1986. Vol. 190. P. 487–498.
108. Chen B.-I., Shellmann J.A. // *Biochemistry.* 1989. Vol. 28. P. 685–691.
109. Lattman E.E., Rose G.D. // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1993. Vol. 90. P. 439–441.
110. Fersht A.R. // *FEBS Lett.* 1993. Vol. 325. P. 5–16.
111. Matouschek A., Kellis J.T., Serrano L., Fersht A.R. // *Nature.* 1989. Vol. 340. P. 122–126.
112. Matouschek A., Kellis J.T., Serrano L. et al. // *Ibid.* 1990. Vol. 346. P. 440–445.
113. Fersht A.R., Matouschek A., Serrano L. // *J. Mol. Biol.* 1992. Vol. 224. P. 771–782.
114. Sachs D.H., Schechter A.N., Eastlake A., Anfinsen C.B. // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1972. Vol. 69. P. 3790–3795.
115. Sachs D.H., Schechter A.N., Eastlake A., Anfinsen C.B. // *J. Immunol.* 1972. Vol. 109. P. 1300–1310.
116. Hurrell J.D.K., Smith J.A., Leach S.J. // *Biochemistry.* 1977. Vol. 16. P. 175–185.
117. Furie B., Schechter A.N., Sachs D.H., Anfinsen C.B. // *J. Mol. Biol.* 1975. Vol. 92. P. 497–505.
118. Hawley S.A., Macleod R.M. // *Ibid.* 1976. Vol. 103. P. 655–664.
119. Blum A.D., Smallcombe S.H., Baldwin R.L. // *Ibid.* 1978. Vol. 118. P. 305–316.
120. Sugawara T., Kuwajima K., Sugai S. // *Biochemistry.* 1991. Vol. 30. P. 2698–2706.
121. Rober H., Wuthrich K. // *Proteins.* 1986. Vol. 1. P. 34–42.
122. Rober H., Elove G.A., Englander S.W. // *Nature.* 1988. Vol. 335. P. 694–699.
123. Udgaonkar J.B., Baldwin R.L. // *Ibid.* P. 700–704.
124. Bycroft M., Matouschek A., Kellis J.T. et al. // *Ibid.* 1990. Vol. 346. P. 488–490.

125. *Beasty A.M., Hurle M.R., Manz J.T.* et al. // *Biochemistry*. 1986. Vol. 25. P. 2965–2974.
126. *Goldenberg D.P., Frieden R.W., Haack J.A., Morrison T.B.* // *Nature*. 1989. Vol. 338. P. 127–132.
127. *Winter G., Fersht A.R., Wilkinson A.J.* et al. // *Ibid*. 1982. Vol. 299. P. 756–758.
128. *Fersht A.R., Wilkinson A.J.* // *Biochemistry*. 1985. Vol. 24. P. 5858–5861.
129. *Fersht A.R.* // *Ibid*. 1987. Vol. 26. P. 8031–8037.
130. *Matouschek A., Kellis J.T., Serrano L., Fersht A.R.* // *Nature*. 1989. Vol. 340. P. 122–126.
131. *Matouschek A., Kellis J.T., Serrano L.* et al. // *Ibid*. 1990. Vol. 346. P. 440–445.
132. *Wells T.N., Fersht A.R.* // *Biochemistry*. 1986. Vol. 25. P. 1881–1886.
133. *Fersht A.R., Serrano L.* // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1993. Vol. 3. P. 75–83.
134. *Horovitz A., Fersht A.R.* // *J. Mol. Biol.* 1990. Vol. 214. P. 613–617.
135. *Serrano L., Horovitz A., Avron B.* et al. // *Biochemistry*. 1990. Vol. 29. P. 9343–9352.
136. *Serrano L., Bycroft M., Fersht A.R.* // *J. Mol. Biol.* 1991. Vol. 218. P. 465–475.
137. *Serrano L., Kellis J.T., Cann P.* et al. // *Ibid*. P. 783–804.
138. *Serrano L., Matouschek A., Fersht A.R.* // *Ibid*. P. 805–818.
139. *Matouschek A., Serrano L., Fersht A.R.* // *Ibid*. P. 819–835.
140. *Matouschek A., Serrano L., Meiering E.M.* et al. // *Ibid*. P. 837–845.
141. *Serrano L., Matouschek A., Fersht A.R.* // *Ibid*. P. 847–859.
142. *Mauguen Y., Hartley R.W., Dodson E.J.* et al. // *Nature*. 1982. Vol. 297. P. 162–164.
143. *Baudet S., Janin J.* // *J. Mol. Biol.* 1991. Vol. 214. P. 123–132.
144. *Bycroft M., Ludvigsen S., Fersht A.R., Poulsen F.M.* // *Biochemistry*. 1991. Vol. 30. P. 8697–8701.
145. *Hartley R.W.* // *Ibid*. 1975. Vol. 14. P. 2367–2370.
146. *Kellis J.T., Nyberg K., Sali D., Fersht A.R.* // *Nature*. 1988. Vol. 333. P. 784–786.
147. *Kellis J.T., Nyberg K., Fersht A.R.* // *Biochemistry*. 1989. Vol. 28. P. 4914–4922.
148. *Serrano L., Bycroft M., Fersht A.R.* // *J. Mol. Biol.* 1991. Vol. 218. P. 465–475.
149. *Horovitz A., Serrano L., Avron A.* et al. // *Ibid*. 1990. Vol. 216. P. 1031–1044.
150. *Levitt M., Chothia C.* // *Nature*. 1976. Vol. 261. P. 552–558.
151. *Tanford C.* // *Adv. Protein Chem.* 1968. Vol. 23. P. 121–282.
152. *Спирин А.С.* Молекулярная биология. Структура рибосомы и биосинтез белка. М.: Высш. шк., 1986.
153. *Hamlin J., Zabin I.* // *Proc. Nat. Acad. Sci. US*. 1972. Vol. 69. P. 412–416.
154. *Понов Е.М.* Естествознание и проблема белка. М.: Высш. шк., 1989.
155. *Anson M.L.* // *Adv. Protein Chem.* 1945. Vol. 2. P. 361–386.
156. *Taniuchi H., Anfinsen C.B., Sodia A.* // *Proc. Nat. Acad. Sci. US*. 1967. Vol. 58. P. 1235.
157. *Taniuchi H., Anfinsen C.B.* // *J. Biol. Chem.* 1971. Vol. 246. P. 2291–2300.
158. *Perutz M.F., Kendrew J.C., Watson H.C.* // *J. Mol. Biol.* 1965. Vol. 13. P. 669–675.
159. *Epstein C.J.* // *Nature*. 1966. Vol. 210. P. 25–28.
160. *Richards F.M.* // *Proc. Nat. Acad. Sci. US*. 1958. Vol. 44. P. 162–166.
161. *Спирин А.С., Киселев Н.А., Шакулов Р.С., Богданов А.А.* // *Биохимия*. 1963. Т. 28. С. 920–930.
162. *Spirin A.S., Belitsina N.V.* // *J. Mol. Biol.* 1966. Vol. 15. P. 282–283.
163. *Hosokawa K., Fujumura R., Nomura M.* // *Proc. Nat. Acad. Sci. US*. 1966. Vol. 55. P. 198–204.
164. *Held W.A., Ballon B., Mizushima S., Nomura M.* // *J. Biol. Chem.* 1974. Vol. 249. P. 3103–3111.
165. *Traub P., Nomura M.* // *J. Mol. Biol.* 1969. Vol. 40. P. 391–413.
166. *Mizushima S., Nomura M.* // *Nature*. 1970. Vol. 226. P. 1214–1218.
167. *Popot J.-L., Gerchman S.-E., Engelman D.M.* // *J. Mol. Biol.* 1987. Vol. 198. P. 655–676.
168. *Surrey T., Jahnig F.* // *Proc. Nat. Acad. Sci. US*. 1992. Vol. 89. P. 7457–7461.
169. *Metzler D.E.* *Biochemistry*. N.Y.: Acad. press, 1977.
170. *Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж.* и др. Молекулярная биология клетки. М.: Мир, 1986. Т. 1.
171. *Baldwin R.L.* // *Trends Biochem. Sci.* 1989. Vol. 14. P. 291–294.
172. *Jaenicke R.* // *Biochemistry*. 1991. Vol. 30. P. 3147–3160.
173. *Pittsyan O.B.* // *J. Protein Chem.* 1987. Vol. 6. P. 273–293.
174. *Fisher G., Schmid F.X.* // *Biochemistry*. 1990. Vol. 29. P. 2205–2212.
175. *Kim P.S., Baldwin R.L.* // *Annu. Rev. Biochem.* 1990. Vol. 59. P. 631–660.

176. Dintzis H.M. // *Proc. Nat. Acad. Sci. US*. 1961. Vol. 47. P. 247–252.
177. Canfield K.E., Anfinsen C.B. // *Biochemistry*. 1963. Vol. 2. P. 1073–1078.
178. De Lorenzo F., Goldberger R.F., Steers E. et al. // *J. Biol. Chem.* 1966. Vol. 241. P. 1562–1569.
179. Fuchs S., De Lorenzo F., Anfinsen C.B. // *Ibid.* 1967. Vol. 242. P. 398–406.
180. Edman J.C., Ellis L., Blancher R.W. et al. // *Nature*. 1985. Vol. 317. P. 267–270.
181. Bachinger H.P., Compton L.A. // *J. Cell. Biochem. Suppl.* 1991. Vol. 15G. P. 188.
182. Lang K., Schmid F.X., Fischer G. // *Nature*. 1987. Vol. 329. P. 268–270.
183. Schonbrunner E.R. // *J. Biol. Chem.* 1991. Vol. 266. P. 3630–3635.
184. Bullied N.J., Freedman R.B. // *Nature*. 1988. Vol. 335. P. 649–671.
185. Freedman R.B. // *Trends Biochem. Sci.* 1984. Vol. 9. P. 438–441.
186. Roth R.A., Pierce S.B. // *Biochemistry*. 1987. Vol. 26. P. 4179–4182.
187. Freedman R.B., Hawkins H.C., Murrant S.J., Reid L. // *Biochem. Soc. Trans.* 1988. Vol. 16. P. 96–99.
188. Holmgren A.A. // *Rev. Biochem.* 1985. Vol. 54. P. 237–271.
189. Noiva R., Lennars W.J. // *J. Biol. Chem.* 1992. Vol. 267. P. 3553–3556.
190. Freedman R.B., Bulleid N.J., Hawkins H.C., Paver J.L. // *Biochem. Soc. Symp.* 1989. Vol. 55. P. 167–192.
191. Lamantia M.L. // *Proc. Nat. Acad. Sci. US*. 1991. Vol. 88. P. 4453–4457.
192. Wetterau J.R., Combs K., Spinner S.N., Joiner B.J. // *J. Biol. Chem.* 1990. Vol. 265. P. 9800–9807.
193. Gething M.-J., Sambrook J. // *Nature*. 1992. Vol. 335. P. 33–45.
194. Popov E.M., Zheltova V.N. // *J. Mol. Struct.* 1971. Vol. 10. P. 221–230.
195. Costain C.C., Dowling J.M. // *J. Chem. Phys.* 1960. Vol. 32. P. 158–165.
196. Понов Е.М., Желтова В.Н. // *Журн. приклад. спектроскопии*. 1971. Т. 14. С. 122.
197. Creighton T.E. *Proteins: Structures and molecular properties*. N.Y.: Freeman, 1983.
198. Evans P.A., Dobson C.M., Kantz R.A. et al. // *Nature*. 1987. Vol. 329. P. 266–268.
199. Chazin W.J., Kordel J., Drakenberg T. et al. // *Proc. Nat. Acad. Sci. US*. 1989. Vol. 86. P. 2195–2198.
200. Brandts J.F., Halvorson H.R., Brennan M. // *Biochemistry*. 1975. Vol. 14. P. 4953–4963.
201. Creighton T.E. // *J. Mol. Biol.* 1978. Vol. 125. P. 401–406.
202. Schmid F.X. // *FEBS Lett.* 1986. Vol. 198. P. 217–220.
203. Schmid F.X., Graft R., Wrba A., Beintema J.J. // *Proc. Nat. Acad. Sci. US*. 1986. Vol. 83. P. 872–876.
204. Ramdas L., Nall B.T. // *Biochemistry*. 1986. Vol. 25. P. 6959–6964.
205. Kelley R.F., Richards F.M. // *Ibid.* 1987. Vol. 26. P. 6765–6774.
206. Jaenicke R. // *Ibid.* 1991. Vol. 30. P. 3147–3161.
207. Stamms M.A., Shieh B.-H., Chuman L. et al. // *Cell*. 1991. Vol. 65. P. 219–227.
208. Schreiber S.L. // *Science*. 1991. Vol. 251. P. 283–287.
209. Laskey R.A., Honda B.M., Mills A.D., Finch J.T. // *Nature*. 1978. Vol. 275. P. 416–420.
210. Barracloagh R., Ellis R.J. // *Biochim. et biophys. acta*. 1980. Vol. 608. P. 19–31.
211. Musgrove J.E., Ellis R.J. // *Philos. Trans. Roy. Soc. London B*. 1986. Vol. 313. P. 419.
212. Hendrix R.W. // *J. Mol. Biol.* 1979. Vol. 129. P. 375–392.
213. Pelham H.R.B. // *Cell*. 1986. Vol. 46. P. 956–961.
214. Ellis R.J. // *Nature*. 1987. Vol. 328. P. 378–379.
215. Ellis R.J., Hemmingsen S.M. // *Trends Biochem. Sci.* 1989. Vol. 14. P. 339–342.
216. Ellis R.J., Van der Vies S.M., Hemmingsen S.M. // *Biochem. Soc. Symp.* 1989. Vol. 55. P. 145–153.
217. Ellis R.J. // *Science*. 1990. Vol. 25. P. 954–959.
218. Ellis R.J. // *Seminars Cell Biol.* 1990. Vol. 1. P. 1–47.
219. Ellis R.J., Van der Vies S.M. // *Annu. Rev. Biochem.* 1991. Vol. 60. P. 321–347.
220. Ellis R.J. // *Philos. Trans. Roy. Soc. London B*. 1993. Vol. 339. P. 257–261.
221. Jaenicke R. // *Ibid.* P. 287–295.
222. Craig E.A., Gross C.A. // *Trends Biochem. Sci.* 1991. Vol. 16. P. 135–140.
223. Lorimer G.H., Todd M.J., Viltanen P.V. // *Philos. Trans. Roy. Soc. London B*. 1993. Vol. 339. P. 297–304.
224. Welch W.J. // *Ibid.* P. 327–333.
225. Parsell D.A., Tautien J., Lindquist S. // *Ibid.* P. 279–286.

226. Bochkareva E.S., Lissin N.M., Girshovich A.S. // *Nature*. 1988. Vol. 336. P. 254–257.
227. Lubben T.H., Donaldson E.K., Viltanen P.V., Gatenby A.A. // *Plant Cell*. 1989. Vol. 1. P. 1223–1230.
228. Collier D.N., Bankaltis V.A., Weiss J.B., Bassford P.J., Jr. // *Cell*. 1988. Vol. 53. P. 273.
229. Crooke E., Guthrie B., Lecker S. et al. // *Ibid*. Vol. 54. P. 1003–1011.
230. Kumamoto C.A. // *Mol. Microbiol*. 1991. Vol. 5. P. 19–22.
231. Phillips G.J., Silhavy T.J. // *Nature*. 1990. Vol. 344. P. 882–884.
232. Kusakawa N., Yura T., Chiharu U. et al. // *EMBO J*. 1987. Vol. 8. P. 3517–3521.
233. Georgopoulos C., Ang D., Liberek K. // *Stress proteins in biology and medicine* / Ed. R.I. Morimoto et al. Cold Spring Harbor, N.Y., 1990. P. 191–221.
234. Zylitz M., Le Bowitz J.H., McMacken R., Georgopoulos C. // *Proc. Nat. Acad. Sci. US*. 1983. Vol. 80. P. 6431–6435.
235. Liberek K., Georgopoulos C., Zylitz M. // *Ibid*. 1988. Vol. 85. P. 6632–6636.
236. Georgopoulos C., Ang D. // *Seminars Cell Biol*. 1990. Vol. 1. P. 19–25.
237. Prevellge P., Thomas D., King J. // *J. Mol. Biol*. 1988. Vol. 202. P. 743–757.
238. Clarke C.F. // *Mol. and Cell. Biol*. 1988. Vol. 3. P. 1206–1215.
239. Wickner S., Hoskins J., McKenney K. // *Nature*. 1991. Vol. 350. P. 165–167.
240. Sambrook J.F., Gething M.J. // *Ibid*. 1989. Vol. 342. P. 224–225.
241. Goloubinoff P., Christeller J.T., Gatenby A.A., Lorimer G.H. // *Ibid*. P. 884–889.
242. Viltanen P.V., Lubben T.H., Reed J. // *Biochemistry*. 1990. Vol. 29. P. 5665–5671.
243. Gatenby A.A., Ellis R.J. // *Annu. Rev. Cell Biol*. 1990. Vol. 6. P. 125–149.
244. Goloubinoff P., Gatenby A.A., Lorimer G.H. // *Nature*. 1989. Vol. 337. P. 44–47.
245. Lorimer G.H., Viltanen P.V., Van der Vies S.M. et al. // *J. Cell Biochem. Suppl*. 1991 Vol. 15G. P. 160.
246. Hemmingsen S.M. // *Nature*. 1988. Vol. 333. P. 330–334.
247. Kang P.J. // *Ibid*. 1990. Vol. 348. P. 137–143.
248. Scherer P.E., Krieg U.C., Hwang S.T. et al. // *EMBO J*. 1990. Vol. 9. P. 4315–4322.
249. Cheng M.Y. // *Nature*. 1989. Vol. 337. P. 620–625.
250. Cheng M.Y., Hartl F.-U., Horwich A.L. // *Ibid*. 1990. Vol. 348. P. 455–458.
251. Ostermann J., Horwich A.L., Neupert W., Hartl F.-U. // *Ibid*. 1989. Vol. 341. P. 125–130.
252. Vogel J.P., Misra L.M., Rose M.D. // *J. Cell Biol*. 1990. Vol. 110. P. 1885–1895.
253. Gething M.J., McCammon K., Sambrook J. // *Cell*. 1986. Vol. 46. P. 939–950.
254. Bole D.G., Hendershot L.M., Kearney J.F. // *J. Cell Biol*. 1986. Vol. 102. P. 1558–1562.
255. Ng D.T.W., Randall R.E., Lamb R.A. // *Ibid*. 1989. Vol. 109. P. 3273–3289.
256. Dorner A.J., Bole D.G., Kaufman R.J. // *Ibid*. 1987. Vol. 105. P. 2665–2674.
257. Blount P., Merlie J.P. // *Ibid*. 1991. Vol. 113. P. 1125–1132.
258. Sharma S., Brandsma J., Rodgers L. et al. // *EMBO J*. 1985. Vol. 4. P. 1479–1489.
259. Bird P., Gething M.J., Sambrook J. // *J. Cell Biol*. 1987. Vol. 105. P. 2905–2914.
260. Bonifacino J.S. // *J. Biol. Chem*. 1988. Vol. 263. P. 8965–8971.
261. Pettey C.L., Alarcon B., Malin R. et al. // *Ibid*. 1987. Vol. 262. P. 4854–4859.
262. Degen E., Williams D.B. // *J. Cell Biol*. 1991. Vol. 112. P. 1099–1115.
263. Beckmann R.P., Mizzen L.A., Welch W.J. // *Science*. 1990. Vol. 248. P. 850–854.
264. Chirico W.J., Waters M.G., Blobel G. // *Nature*. 1988. Vol. 332. P. 805–809.
265. Deshaies R.J., Koch B.D., Werner-Washburne M. et al. // *Ibid*. P. 800–805.
266. Murakami H., Pain D., Blobel G. // *J. Cell Biol*. 1988. Vol. 107. P. 2051–2057.
267. Rothman J.E., Schmid S.L. // *Cell*. 1986. Vol. 46. P. 5–9.
268. De Luca-Flaherty C., McKay D.B., Parham P., Hill B.L. // *Cell*. 1990. Vol. 62. P. 87.
269. Chiang H.-L., Terlecky S.R., Plant C.P., Dice J.F. // *Science*. 1989. Vol. 246. P. 382–385.
270. Dice J.F. // *Trends Biochem. Sci*. 1990. Vol. 376. P. 305–309.
271. Dice J.F., Chiang H.-L. // *Biochem. Soc. Symp*. 1989. Vol. 55. P. 45–55.
272. Picard D. // *Nature*. 1990. Vol. 348. P. 166–168.
273. Picard D., Salser S.J., Yamamoto K.R. // *Cell*. 1988. Vol. 54. P. 1073–1080.
274. Dalman F.C. // *J. Biol. Chem*. 1989. Vol. 264. P. 19815–19821.
275. Brugge J.S., Erikson E., Erikson R. // *Cell*. 1981. Vol. 25. P. 363–372.
276. Brugge J.S., Yuenomoto W., Darrow D. // *Mol. and Cell. Biol*. 1983. Vol. 4. P. 269.
277. Craig E.A. // *Annu. Rev. Genet*. 1988. Vol. 22. P. 631–677.
278. Pelham H.R.B. // *Stress proteins in biology and medicine* / Ed. R.I. Morimoto et al. Cold Spring Harbor, N.Y., 1990. P. 287–299.

279. Dingwall C., Laskey R.A. // *Seminars Cell Biol.* 1990. Vol. 1. P. 11–17.
280. Flaherty K.M., De Luca-Flaherty C., McKay D.B. // *Nature.* 1990. Vol. 346. P. 623–628.
281. Flaherty K.M., McKay D.B., Kabsch W., Holmes K.C. // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1991. Vol. 88. P. 5041–5045.
282. Korn E.D., Calier M.-F., Pantaloni D. // *Science.* 1987. Vol. 238. P. 638–644.
283. Rippmann F., Taylor W.R., Rothbard J.B., Green N.M. // *EMBO. J.* 1991. Vol. 10. P. 1053–1059.
284. Hendrick J., Hartl F.-U. // *Annu. Rev. Biochem.* 1993. Vol. 62. P. 349–384.
285. Mazzarella R.A., Green M. // *J. Biol. Chem.* 1987. Vol. 262. P. 8875–8883.
286. Csermely P., Kahn C.R. // *Ibid.* 1991. Vol. 266. P. 4943–4950.
287. Horwich A.L., Willison K.R. // *Phillos. Trans. Roy. Soc. London B.* 1993. Vol. 339. P. 313–326.
288. McMullin T.W., Hallberg R.L. // *Mol. and Cell. Biol.* 1988. Vol. 8. P. 371–380.
289. Hendrix R.W. // *J. Mol. Biol.* 1979. Vol. 129. P. 375–392.
290. Gao J., Thomas O., Chow R.L. et al. // *Cell.* 1992. Vol. 69. P. 1043–1050.
291. Lewis V.A., Heynes G.M., Zhing D. et al. // *Nature.* 1992. Vol. 358. P. 249–252.
292. Jaffe M.B., Farr G.N., Miklos D., Horwich A.L. // *Ibid.* P. 245–248.
293. Trent J.D., Nimmesgern E., Wall J.S. et al. // *Ibid.* 1991. Vol. 354. P. 490–493.
294. Holl-Neugebauer B., Rudolph R., Schmidt M., Buchner J. // *Biochemistry.* 1991. Vol. 30. P. 11609–11614.
295. Landri S.J., Gierash L.M. // *Ibid.* P. 7359–7362.
296. Martin J., Hartl F.U. // *Structure.* 1993. Vol. 1. P. 161–164.
297. Dill K.A. // *Biochemistry.* 1985. Vol. 24. P. 1501–1509.
298. Bowie J.U., Saner R.T. // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1989. Vol. 86. P. 2152–2156.
299. Dill K.A. // *Biochemistry.* 1990. Vol. 29. P. 7135–7155.
300. Ohgushi M., Wada A. // *FEBS Lett.* 1983. Vol. 164. P. 21–24.
301. Kuwajima K. // *Proteins.* 1989. Vol. 6. P. 87–103.
302. Baum J., Dobson C.M., Evans P.A., Hanley C. // *Biochemistry.* 1989. Vol. 28. P. 7–13.
303. Ptitzyn O.B., Pain R.H., Semisotnov G.V. et al. // *FEBS Lett.* 1990. Vol. 262. P. 20–24.
304. Лим В.И. // *Биофизика.* 1974. Т. 19. С. 562–575.
305. Лим В.И. // *ДАН СССР.* 1975. Т. 222. С. 1467–1469.
306. Lim V.I., Efimov A.V. // *FEBS Lett.* 1976. Vol. 69. P. 41–44.
307. Лим В.И., Мазанов А.Л., Ефимов А.В. // *Молекуляр. биология.* 1978. Т. 12. С. 206.
308. Лим В.И. // *Там же.* С. 213–218.
309. Мазанов А.Л., Лим В.И. // *Там же.* С. 219–232.
310. Chothia C., Levitt M., Richardson D. // *J. Mol. Biol.* 1981. Vol. 145. P. 215–250.
311. Kim P.S., Baldwin R.L. // *Annu. Rev. Biochem.* 1982. Vol. 51. P. 459–489.
312. Karplus M., Weaver D.L. // *Nature.* 1976. Vol. 260. P. 404–406.
313. Bashford D., Cohen F.E., Karplus M. et al. // *Proteins.* 1988. Vol. 4. P. 211–227.
314. Chothia C., Finkelstein A.V. // *Annu. Rev. Biochem.* 1990. Vol. 59. P. 1007–1039.
315. Moulton J., Unger R. // *Biochemistry.* 1991. Vol. 30. P. 3816–3824.
316. Куни Ф.М. *Статистическая физика и термодинамика.* М.: Наука, 1981. 351 с.
317. Зоммерфельд Ф. *Термодинамика и статистическая физика.* М.: Изд-во иностр. лит., 1955.
318. Пригожин И. *От существующего к возникающему.* М.: Мир, 1985. 411 с.
319. Гленсдорф П., Пригожин И. *Термодинамическая теория структуры, устойчивости и флуктуации.* М.: Мир, 1973. 341 с.
320. Ландау Л.Д., Лифшиц Е.М. *Статистическая физика.* М.: Наука, 1976. 450 с.
321. Eddington A. *The nature of the physical world.* Ann. Arbor: Univ. Mich. press, 1958. 301 p.
322. Белоусов Б.П. // *Рефераты по радиационной медицине за 1958 г.* М.: Медгиз, 1959. С. 145.
323. Жаботинский А.М. // *Биофизика.* 1964. Т. 9. С. 306–315.
324. Жаботинский А.М. *Концентрационные автоколебания.* М.: Наука, 1974.
325. Nemethy G., Scheraga H.A. // *J. Chem. Phys.* 1962. Vol. 36. P. 3382–3400.
326. Wetlaufer D.B. // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1973. Vol. 70. P. 697–701.
327. Попов Е.М. *Структурная организация белков.* М.: Наука, 1989.
328. Попов Е.М. *Структурно-функциональная организация белков.* М.: Наука, 1992.

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

Аденилаткиназа 261, 262, 293, 318
Аденилатциклаза 210–214
Актины 122 и сл.
Алгоритмы предсказания вторичных структур 244 и сл.
Альбумин(ы) 13, 14, 17, 25
Альдолаза 354
Ангиотензин 93
АТРаза(ы)
– Na^+ , K^+ - 175–181, 197–200, 214
– F_1F_0 - 181–189
– H^+ - 213
АТР-синтетаза 181, 189, 190
Ацетилхолиновый рецептор 207, 215

Бактериородопсин 60, 168, 201, 202, 213, 215
Бактериофаг Т4 171
Барназа 392–405
Белок(ки) (см. также по названиям)
– аргининсвязывающий (АСБ) 192
– вируса табачной мозаики 232
– глобулярные 11–17, 23–29, 37–49, 93, 233, 302 и сл.
– дисульфидная изомераза 411, 413–415, 418
– дисульфидные связи 359 и сл.
– ДНК-связывающие 107 и сл.
– иммунной системы 66 и сл.
– Na-канала 207
– кристаллизация 193 и сл.
– двухмерная 174 и сл.
– мембранные 56 и сл., 80, 180 и сл.
– метастабильные состояния 339, 348–378
– мышечные 7, 10, 129
– полосы III из мембраны эритроцитов человека 58
– скелетных мышц 119 и сл.
– фибриллярные 7, 11–29, 36–49, 233
– цистеинсодержащие 357 и сл.
– hsp 421–426
Бифуркация 454–459, 462–466
Брюсселятор 451, 452, 455

Взаимодействия

– ван-дер-ваальсовы 236 и сл.
– гидрофобные 237, 342, 347, 393, 394, 432
– дисперсионные 342, 345, 393–395
– электростатические 236 и сл.
Водородная связь 232 и сл.

β -Галактозидаза 407

Гемоглобин 14–27, 41, 43 и сл., 57, 109, 157, 229, 232, 243–248, 257, 264
Гидрофобное схлопывание ("hydrophobic collapse") 410, 432
Гистоны 109 и сл., 162
Гликозидазы 415, 428
Гликофорин 58
Глицеральфосфатдегидрогеназа 354
Глюкагон 278

Денатурация белков 231–242, 264, 289–300, 338–412, 432

Диастаза 259

ДНК-топоизомеразы 113 и сл.
Домены 307 и сл.

Желатин 9

Излучение синхротронное 137 и сл., 164

Иммуноглобулины 307, 308, 320, 413
Инсулин 17, 27, 38–44, 53, 259, 278, 286, 357

Карбоангидраза 351

Карбоксипептидаза 257–264, 269–271, 305, 306, 342, 345

Карта(ы)

– Кунтца 91
– Паттерсона 162
– распределения оптической плотности 171
Кератин 11–14, 16, 18, 20–32, 43, 232, 303
Коллаген 9, 11, 13, 23, 415
Конканавалин 259, 260, 305, 306
Крамбин 279

Лактатдегидрогеназа 354

Лактоглобулин 17, 347
 α -Латротоксин 194–196

Лизоцим 50 и сл., 229, 243–248, 258, 259, 269–271, 281, 305, 306, 310, 341, 347–353, 378, 379

Малатдегидрогеназа 354

Метгемоглобин 17

Метод(ы)

– диффузии 231

– изоморфного замещения 40, 41, 44–46, 156–162, 167

– изотопного обмена 166, 386, 387

– иммунологический 385, 387

– кластеризации 209

– кругового дихроизма 386, 387

– Лауэ 147, 150–152

– мультитлинноволновой аномалии дифракции 156 и сл.

– нейтронной кристаллографии 164 и сл., 231

– остановленной струи 386, 387

– Паттерсона 40, 41

– проб и ошибок 40, 41

– прямой, расшифровки кристаллических структур 40, 41, 213

– рассеяния рентгеновских лучей под малыми углами 231

– рентгеноструктурного анализа 7 и сл., 38 и сл., 54 и сл., 137 и сл., 231

– светорассеяния 231

– седиментации 231

– флуоресценции 386, 387

– Ханби 29

– электронной микроскопии 167 и сл., 231

– ЯМР 346, 369, 386–392, 425, 428

Механизм

– мышечного сокращения 131 и сл.

– триптического гидролиза 150

– функционирования галоалкандегидрогеназы 148 и сл.

Миоген 260, 305, 306

Миоглобин 19–25, 43, 46 и сл., 153 и сл., 229–248, 259–264, 286, 305, 306, 319, 341, 347, 350, 385, 409, 411

Миозин 11, 12, 14, 18, 23, 25, 28, 120 и сл., 124

Миоцим 347

Модель(и) полипептидов

– Амброзе 18

– Астбери 12–15

– Брэгга, Кендрию и Перутца 19, 20

– диффузионно-коллизонная 432

– каркасная ("framework model") 432

– Лотки–Вольтерра (см. "хищники–жертвы") 452–462

– Полинга и Кори 21 и сл., 229

Пригожина–Лефевра–Николиса (см. брасселятор) 451, 455

Птицына 284 и сл.

– Ринч 17

– Хаггинса 15–18

– Цана 18

Мутагенез 385–392, 421

– сайт-направленный 385 и сл.

Негэнтропия 446, 447, 462

Нейротоксин II 293

Нуклеаза стафилококковая 232, 259, 264, 308, 310, 351, 355, 385, 409, 411

Нуклеоплазмин 420, 421, 423

Панкреатический трипсиновый бычий ингибитор (БПТИ) 259, 282–295, 318, 344, 346, 358–384

Пенициллиназа 351

Пенициллопепсин 80, 81, 98, 101

Пепсин 40, 43, 81, 286, 308

Пептидилпролил-*цис-транс*-изомераза 413–418

Пируваткиназа 318

Простагландин-Н₂-синтаза 64 и сл.

Протеиназы

– аспартатные 80 и сл.

– вируса саркомы Роуза 80, 82

– механизм каталитической реакции 99

– сериновые 150

– HIV-1 85 и сл., 103

Ренатурация белков 352–416, 428

Ренин 80 и сл., 93 и сл.

Рибонуклеаза 28, 44, 53, 166, 232–264, 301, 310, 318, 341–356, 373–378, 385, 408, 411, 416

Родопсин 180, 182

"Рубиско" 419, 422, 428

Рубредоксин 260, 261

Свертывание белка 280–302, 313, 338–393, 400–417, 426–432, 459–466

Синтетические полипептиды 285, 325, 331, 345, 460

Соматотропин (бычий, свиной) 323–325, 327

Спектрин 58

Структура(ы)

– актиновых нитей 122 и сл.

– антигена HLA-DR1 класса II 74 и сл.

– белка

– – вторичная 27, 38, 49, 50, 231, 243–305, 310–320, 342–344, 377, 386, 393, 404, 432

– – – β-изгиб 249–259, 265–278, 292–298, 328, 394, 403

– – – Ω-петля 276, 277, 394 и сл.

– – – β-складчатый лист 22 и сл., 230–235, 247–329, 342–369, 393–403, 425–428

– – – α-спираль 229–343, 358–369, 386–405, 425–428

– – первичная 27, 229, 230, 317, 343, 344

– – супервторичная 284, 303, 317, 321–331

- третичная 27, 47–53, 231, 317, 319, 343, 407, 432
- трехмерная 46 и сл., 56, 80, 196 и сл., 230 и сл.
- четвертичная 27, 47, 119, 351, 407, 427
- внеклеточного домена аспартатного рецептора бактерии *Salmonella typhimurium* 62 и сл.
- внеклеточного фрагмента
- корецептора CD8 Т-лимфоцитов 70 и сл.
- рецептора CD4 72 и сл.
- β -галактозидазы 117 и сл.
- гистонового кора нуклеосомы 109 и сл.
- диссипативные 453–458, 462, 463
- комплекса гормона роста человека с внешней частью рецептора 61 и сл.
- N-концевого фрагмента ДНК-топоизомеразы I 113 и сл.
- миозиновых нитей 123 и сл.
- стабильность 230
- Субтилизин 259, 261, 269, 305, 306

Теория(и)

- клональной селекции 67
- переноса генетической информации и регуляции синтеза белка 118

Термодинамика

- неравновесных процессов 439–459
- линейная 439 и сл.
- нелинейная 448 и сл.
- равновесная 433–439

Тиоредоксин 413–415

Тирозил-тРНК-синтетаза 386

Триглицеридтрансфераза 415

Трипсиноген 258

Тропонины 123

Фактор(ы)

- аномального рассеяния 157
- Лорентца 45
- расходимости (R) 41
- частичной поляризации 45
- Ферродоксин 278
- Фибриноген 11, 12, 14
- Фиброин 8–16, 22, 28, 32
- Флуктуации 450–457, 463–466
- Фумараза 354
- Функция распределения (Паттерсона) 41, 43

Химотрипсин 17, 53, 246–271, 286, 305–314, 347, 350

Хипотрипсиноген 346, 349

Цитохром *b₅* 260, 305

Цитохром *c* 253–259, 278, 292, 293, 318, 350–355

– -оксидаза 200–202, 213, 214

– пероксидаза 151 сл.

Шапероны 412, 413, 418–430

Эдестин 13, 17

Эксельсин 13, 17

Эластаза 255, 259, 310

Энолаза 354

Эндонуклеаза 162

Эпидермин 11, 12, 25

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПРЕДИСЛОВИЕ <i>В. Т. Иванов, Е. М. Попов</i>	5
--	---

Часть I

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОСТРАНСТВЕННОГО СТРОЕНИЯ БЕЛКОВ

Глава 1. СТРУКТУРНЫЕ МОДЕЛИ ПОЛИПЕПТИДНЫХ ЦЕПЕЙ. <i>Е.М. Попов</i>	7
1.1. Первые рентгеноструктурные исследования фибриллярных белков.....	7
1.2. Модели полипептидов Полинга и Кори.....	21
1.3. Пространственное строение синтетических полипептидов.....	28
Глава 2. СТАНОВЛЕНИЕ МЕТОДА РЕНТГЕНОСТРУКТУРНОГО АНАЛИЗА ГЛОБУЛЯРНЫХ БЕЛКОВ <i>Е.М. Попов</i>	38
2.1. Особенности рентгеноструктурного анализа глобулярных белков...	39
2.2. Трехмерные структуры миоглобина и гемоглобина.....	46
2.3. Трехмерная структура лизоцима.....	50
Глава 3. СОВРЕМЕННЫЕ ДОСТИЖЕНИЯ РЕНТГЕНОСТРУКТУР- НЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ БЕЛКОВ <i>Е.М. Попов</i>	54
3.1. Мембранные белки.....	56
3.2. Белки иммунной системы.....	66
3.3. Аспартатные протеиназы.....	80
3.4. ДНК-связывающие белки.....	107
3.5. Белки скелетных мышц.....	119
Глава 4. ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ РЕНТГЕНОСТРУКТУРНОГО АНАЛИЗА БЕЛКОВ <i>Е.М. Попов</i>	137
4.1. Синхротронное излучение.....	138
4.2. Мультидлинноволновая аномальная дифракция.....	156
Глава 5. НЕЙТРОННАЯ КРИСТАЛЛОГРАФИЯ БЕЛКОВ <i>Е.М. Попов</i>	164
Глава 6. ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ БЕЛКОВ <i>В.В. Демин</i>	167
6.1. Общие принципы метода.....	168
6.2. Электронная микроскопия периодических структур.....	172
6.3. Электронная микроскопия неперiodических структур.....	203
Литература.....	215

Часть II

ЭМПИРИЧЕСКИЙ ПОДХОД К ПРЕДСКАЗАНИЮ ПРОСТРАНСТВЕННОГО СТРОЕНИЯ БЕЛКОВ

Е.М. Попов

Глава 7.	ФАКТОРЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ СТАБИЛЬНОСТЬ ТРЕХМЕРНОЙ СТРУКТУРЫ БЕЛКА.....	230
7.1.	Водородная связь.....	232
7.2.	Ван-дер-ваальсовы и электростатические взаимодействия.....	236
7.3.	Гидрофобный эффект.....	237
Глава 8.	ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВТОРИЧНЫХ СТРУКТУР БЕЛКОВ.....	243
8.1.	Алгоритмы предсказания вторичных структур.....	244
8.2.	Точность предсказания вторичных структур.....	266
8.3.	Моделирование свертывания белковой цепи на основе вторичных структур.....	280
8.4.	Компьютерное воспроизведение свертывания белковой цепи.....	287
Глава 9.	ВЫСШИЕ УРОВНИ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ГЛОБУЛЯРНЫХ БЕЛКОВ.....	302
9.1.	Супервторичные структуры.....	303
9.2.	Домены.....	307
9.3.	Комбинированный подход к предсказанию трехмерной структуры белка.....	316
Глава 10.	ПЕРСПЕКТИВЫ ЭМПИРИЧЕСКОГО ПОДХОДА.....	328
	Литература.....	331

Часть III

СВЕРТЫВАНИЕ БЕЛКОВОЙ ЦЕПИ В НАТИВНУЮ КОНФОРМАЦИЮ

Глава 11.	КОНФОРМАЦИОННЫЕ СОСТОЯНИЯ БЕЛКОВОЙ ЦЕПИ <i>Е.М. Попов</i>	338
11.1.	Нативное и денатурированное состояния.....	339
11.2.	Метастабильные состояния.....	348
Глава 12.	РЕНАТУРАЦИЯ ЦИСТЕИНСОДЕРЖАЩИХ БЕЛКОВ <i>Е.М. Попов</i>	357
12.1.	Дисульфидные связи в белках.....	359
12.2.	Фиксация, блокировка и разделение промежуточных состояний.....	363
12.3.	Кинетический путь ренатурации панкреатического трипсинового ингибитора.....	367
12.4.	Ренатурация рибонуклеазы.....	373
12.5.	Ренатурация лизоцима.....	378
Глава 13.	РЕНАТУРАЦИЯ БЕЛКОВ, НЕ СОДЕРЖАЩИХ ДИСУЛЬФИДНЫЕ СВЯЗИ <i>Е.М. Попов</i>	383
13.1.	Сайт-направленный мутагенез.....	385
13.2.	Ренатурация барназы.....	392

Г л а в а 14. СВЕРТЫВАНИЕ БЕЛКОВ В КЛЕТКЕ <i>Е.М. Попов, Е.Д. Шибанова</i>	406
14.1. Ферменты, участвующие в свертывании белков	410
14.2. Молекулярные шапероны.....	418
Г л а в а 15. ОБЩАЯ ТЕОРИЯ СВЕРТЫВАНИЯ БЕЛКОВОЙ ЦЕПИ <i>Е.М. Попов</i>	431
15.1. Элементы равновесной термодинамики.....	433
15.2. Линейная термодинамика неравновесных процессов	439
15.3. Нелинейная термодинамика неравновесных процессов.....	448
15.4. Бифуркационная теория структурной самоорганизации белков.....	459
Литература	466
Предметный указатель	473

Научное издание

Попов Евгений Митрофанович
Демин Виктор Витальевич
Шибанова Елена Дмитриевна

ПРОБЛЕМА БЕЛКА

Том 2

ПРОСТРАНСТВЕННОЕ СТРОЕНИЕ БЕЛКА

Утверждено к печати

Ученым советом

Института биоорганической химии
им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук

Заведующая редакцией

"Наука – биология, химия" Е.В. Тихомирова

Редактор Т.И. Белова

Художник Н.Н. Михайлова

Художественный редактор В.Ю. Яковлев

Технический редактор З.Б. Павлюк

Корректоры А.Б. Васильев, Г.В. Дубовицкая

Набор и верстка выполнены в издательстве
на компьютерной технике

ИБ № 1701

ЛР № 020297 от 27.11.1991

Подписано к печати 15.03.96

Формат 60×90¹/₁₆. Гарнитура Таймс

Печать офсетная

Усл.печ.л. 30,0. Усл.кр.-отт. 30,0. Уч.-изд.л.34,2

Тираж 600 экз. Тип. зак. 3086

Издательство "Наука"

117864 ГСП-7, Москва В-485, Профсоюзная ул., 90

Санкт-Петербургская типография № 1 РАН

199034, Санкт-Петербург В-34, 9-я линия, 12